

**Molekulare Charakterisierung von Ty3-gypsy-Retrotransposons
als abundante Sequenzklasse des Centromers
eines Minichromosoms in *Beta vulgaris* L.**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl. oec. troph. (FH) Beatrice Weber

geboren am 23. August 1975 in Leisnig

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Schmidt
Prof. Dr. rer. nat. Gerold Barth
Prof. Dr. rer. nat. Ingo Schubert

Eingereicht am: 04. September 2007

Verteidigt am: 14. Januar 2008

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLEN-UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Transponierbare Elemente-ubiquitäre Bestandteile eukaryotischer Genome	1
1.1.1	Klassifizierung von transponierbaren Elementen	3
1.1.2	Reverse Transkription von LTR-Retrotransposons	6
1.1.3	Regulierung der Transposition	8
1.2	Die Gattung <i>Beta</i>	9
1.3	Zielstellung der Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Kits und ihre Bezugsquellen	12
2.1.2	Kulturmedien und Antibiotika	13
2.1.3	Oligonukleotide	14
2.1.4	DNA-Sonden	15
2.1.5	Pflanzenmaterial	16
2.1.6	BAC-Bank	17
2.1.7	Computerprogramme	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Anzucht von biologischem Material	17
2.2.1.1	Pflanzenanzucht	17
2.2.1.2	Bakterienanzucht	18
2.2.2	Isolation von DNA	18
2.2.2.1	Isolation pflanzlicher genomischer DNA	18
2.2.2.2	Isolation bakterieller Plasmid-DNA	19
2.2.2.2.1	BAC-Mini-Präparation	19
2.2.2.2.2	BAC-Midi-Präparation	19
2.2.2.2.3	Plasmid-Minipräparation nach Holmes & Quigley	20
2.2.2.2.4	Plasmid-Mini-Präparation über eine Silikaschicht	20
2.2.3	Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	21
2.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.3.2	Pulsfeld-Gelelektrophorese	21
2.2.4	Klonierung von DNA	21
2.2.4.1	Restriktion von genomischer und Plasmid-DNA	21
2.2.4.2	Dephosphorylierung von Plasmidvektoren	21
2.2.4.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
2.2.4.3.1	Extraktion aus Agarosegelen	22
2.2.4.3.2	Elektroelution	22
2.2.4.4	Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.2.4.5	<i>Shot gun</i> -Klonierung	23
2.2.4.6	Transformation von Plasmid-DNA in Wirtsbakterien	24
2.2.4.6.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	24
2.2.4.6.2	Elektroporation	24

2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.5.1	Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen	25
2.2.5.2	Amplifikation klonierter DNA-Sequenzen	25
2.2.5.3	Inverse PCR	25
2.2.6	Southern-Hybridisierung	26
2.2.6.1	Southern-Transfer aus Agarosegelen	26
2.2.6.2	Nukleinsäuretransfer aus Bakterienkulturen (Kolonie-Filter)	26
2.2.6.3	Nukleinsäuretransfer von isolierter Plasmid-DNA (Dot Blot)	27
2.2.6.4	Hybridisierung von DNA-Sequenzen	27
2.2.6.4.1	Hybridisierung	28
2.2.6.4.2	Waschen der Membran und Autoradiographie	28
2.2.6.4.3	Entfernen der DNA-Sonde von der Membran	28
2.2.7	DNA-Sequenzierung	28
2.2.8	Arbeiten mit RNA	29
2.2.8.1	Isolation von Gesamt-RNA	29
2.2.8.2	DNase-Behandlung der RNA	29
2.2.8.3	cDNA-Synthese	30
2.2.8.4	RNA-Gelelektrophorese	30
2.2.8.5	Northern-Hybridisierung	30
2.2.8.5.1	Northern-Transfer aus denaturierenden Agarosegelen	30
2.2.8.5.2	Hybridisierung	30
2.2.8.5.3	Waschen der Membran und Autoradiographie	31
2.2.9	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	31
2.2.9.1	Fixierung des Pflanzenmaterials	31
2.2.9.2	Präparation von Chromosomen	31
2.2.9.3	Markierung der DNA-Sonden für die FISH	33
2.2.9.4	Vorbehandlung, Hybridisierung und Waschen	33
2.2.9.5	Signaldetektion durch Antikörperbehandlung	35
2.2.9.6	Rehybridisierung von Chromosomenpräparaten	35
2.2.9.7	Fluoreszenzmikroskopie	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Subklonierung von minichromosomenspezifischen PRO1-BACs zur Identifizierung von Retrotransposon-Sequenzen	40
3.2	Ermittlung der unbekannten Sequenzen eines Ty3-gypsy-Retrotransposons	40
3.2.1	Isolierung von Retrotransposon-Sequenzen durch PCR-Amplifikation	41
3.2.2	Isolierung von Retrotransposon-Sequenzen durch direkte BAC-Sequenzierung	42
3.2.3	Inverse PCR zur Analyse LTR-flankierender Sequenzbereiche	43
3.3	Nachweis der Existenz vollständiger <i>Beetle1</i>-Kopien in BAC-Klonen	45
3.3.1	<i>Beetle1</i> ist als Amplikon-Contig vollständig darstellbar	46
3.3.2	<i>Beetle1</i> liegt in mehreren Kopien auf dem BAC 125N12 vor	48
3.4	Isolation eines vollständigen <i>Beetle1</i>-Retrotransposons	48
3.4.1	Identifizierung eines BAC-Restriktionsfragments mit einer vollständigen <i>Beetle1</i> -Kopie	49
3.4.2	Molekulare Charakterisierung des LTR-Retrotransposons <i>Beetle1</i>	51
3.4.3	<i>Beetle1</i> ist in ein anderes Ty3-gypsy-Retrotransposon integriert	53

3.5	Identifizierung eines zweiten Ty3-gypsy-Retrotransposons	54
3.5.1	Isolation eines vollständigen <i>Beetle2</i> -Retrotransposons	54
3.5.2	Molekulare Charakterisierung des LTR-Retrotransposons <i>Beetle2</i>	58
3.6	Das Alter von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	59
3.7	Transkription der Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	60
3.7.1	Northern-Analysen	60
3.7.2	Reverse Transkription und RT-PCR	61
3.8	Charakterisierung struktureller und funktioneller Bereiche von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	64
3.8.1	Vergleich der für die Reverse Transkription von LTR-Retrotransposons benötigten Primerbindungsstellen	64
3.8.2	Vergleich funktioneller Aminosäure-Motive im <i>gag-pol</i> -Polyprotein von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	65
3.9	Homologiebeziehungen von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> mit anderen Ty3-gypsy-Retrotransposons	74
3.10	Divergenz der Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	76
3.11	Genomorganisation der Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	78
3.11.1	Abundanz von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> in <i>Beta procumbens</i>	78
3.11.2	Abundanz von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> in <i>Beta</i> -Arten	80
3.12	Chromosomale Lokalisation der Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> durch Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung (FISH)	83
3.12.1	Lokalisierung der <i>Beetle1</i> -Sequenzen auf <i>Beta</i> -Chromosomen	83
3.12.2	Lokalisierung der <i>Beetle2</i> -Sequenzen auf <i>Beta</i> -Chromosomen	85
3.12.3	Detektion von Wildrüben-Chromatin durch die LTRs der <i>Procumbentes</i> -spezifischen Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	86
3.13	Genomischer Kontext von Ty3-gypsy-Retrotransposons in BACs aus der Centromer-Region von PRO1	88
3.13.1	Interspersion des Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> mit dem centromerischen pTS5-Satelliten	88
3.13.2	Integration von <i>Beetle1</i> in Sequenzen von Ty3-gypsy-Retrotransposons	90
3.13.2.1	Integration von <i>Beetle1</i> in das Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>	90
3.13.2.2	Integration von <i>Beetle1</i> in Mitglieder der <i>Beetle1</i> -Familie	92
3.13.3	Deletionen innerhalb des <i>gag-pol</i> -Polyproteins von <i>Beetle1</i>	94
3.13.4	Verteilung von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> in BACs aus der Centromer-Region von PRO1	97
3.13.5	Existenz weiterer Ty3-gypsy-Sequenzen in BACs aus der Centromer-Region von PRO1	99
4	DISKUSSION	102
4.1	Organisation und Struktur von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	104
4.2	Das Alter von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	110

4.3	<i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>-abundante DNA-Komponenten im Genom von <i>Beta procumbens</i>	111
4.4	Konservierung der <i>Beetle1</i>- und <i>Beetle2</i>-Sequenzen und deren Verbreitung in der Gattung <i>Beta</i>	112
4.5	Transkriptionsaktivität von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	113
4.6	Insertionsspezifität und Zielsequenzen von <i>Beetle1</i>	116
4.7	Mechanismen, die der Akkumulation von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> entgegenwirken	118
4.7.1	Eliminierung transponierbarer Elemente	118
4.7.2	Regulation der Aktivität transponierbarer Elemente	122
4.8	<i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>-funktionelle Komponenten des <i>Beta procumbens</i>-Centromers?	125
5	ZUSAMMENFASSUNG	130
6	LITERATUR	
7	ABKÜRZUNGEN	
8	ANHANG	

TABELLEN-UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tab. 1.1:	Taxonomie und Chromosomenzahl (2n) der Gattung <i>Beta</i>	10
Tab. 2.1:	Größenstandards und ihre Bezugsquellen	12
Tab. 2.2:	Enzyme und ihre Bezugsquellen	12
Tab. 2.3:	Kits und ihre Bezugsquellen	12
Tab. 2.4:	Plasmidvektoren und Bakterienstämme	13
Tab. 2.5:	Primerbezeichnung, Sequenz und <i>Annealing</i> -Temperatur allgemeiner und- Repeat-spezifischer Oligonukleotide	14
Tab. 2.6:	Primerbezeichnung, Sequenz und <i>Annealing</i> -Temperatur Retrotransposon- spezifischer Oligonukleotide	14
Tab. 2.7:	Herkunft, Länge und Hybridisierungsort Repeat-spezifischer DNA-Sonden	15
Tab. 2.8:	Herkunft, Länge und Hybridisierungsort Retrotransposon-spezifischer DNA-Sonden	15
Tab. 2.9:	Taxonomie und Chromosomenzahl (2n) der verwendeten Pflanzenarten aus der Gattung <i>Beta</i> und <i>Spinacia</i>	16
Tab. 2.10:	Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	36
Tab. 2.11:	Verwendete Filtersätze und ihre Eigenschaften	36
Tab. 3.1:	Charakterisierung der isolierten centromerischen BACs	39
Tab. 3.2:	Klonbezeichnung und Länge selektierter Subklone des <i>Bam</i> HI-Fragments	50
Tab. 3.3:	Altersberechnung von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> unter Verwendung verschiedener Substitutionsraten	60
Tab. 3.4:	Homologievergleich von PCR-Produkten aus cDNA von <i>B. procumbens</i> mit genomischen Sequenzen aus <i>Beetle1</i>	63
Tab. 3.5:	Homologievergleich von PCR-Produkten aus cDNA von <i>B. procumbens</i> mit genomischen Sequenzen aus <i>Beetle2</i>	63
Tab. 3.6:	Homologie der einzelnen Gene des <i>gag-pol</i> -Polyproteins von <i>Beetle1</i> mit <i>Beetle2</i> und anderen pflanzlichen Ty3- <i>gypsy</i> -Retrotransposons	75
Tab. 3.7:	Divergenz zwischen dem <i>Beetle1</i> -LTR und LTR-Sequenzen aus BAC-Endsequenzen	77
Tab. 3.8:	Divergenzanalyse von Sequenzen aus dem <i>gag-pol</i> -Polyprotein von Retrotransposons der <i>Beetle1</i> -Familie	77
Tab. 3.9:	Divergenzanalyse von Sequenzen aus dem <i>gag-pol</i> -Polyprotein von Retrotransposons der <i>Beetle2</i> -Familie	78

Tab. 3.10:	Integrationsorte von Mitgliedern der <i>Beetle1</i> -Familie, die Sequenz der Target-Side-Duplikation (TSD) und deren Nukleotidposition	94
Abb. 1.1:	Klassifizierung von Retroelementen mit Schwerpunkt auf LTR-Retrotransposons in Pflanzen	5
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der Reversen Transkription eines LTR-Retrotransposons	7
Abb. 3.1:	Modell der Organisation der Satelliten-DNA an <i>Beta procumbens</i> -Centromeren	37
Abb. 3.2:	Selektion von centromerischen BAC-Klonen durch Kolonie-Hybridisierung	37
Abb. 3.3:	<i>HindIII</i> -Subklone des BACs 102A16 kodieren Teile eines Ty3-gypsy-Retrotransposons	40
Abb. 3.4:	PCR-Produkte des BACs 125N12 kodieren <i>Beetle1</i> -Sequenzen	41
Abb. 3.5:	PCR-Produkte des BACs 125N12 kodieren Sequenzen weiterer Ty3-gypsy-Retrotransposons	42
Abb. 3.6:	Interspersion eines LTRs mit dem pTS5-Satelliten innerhalb der Hs1 ^{pro-1} Locus-DNA	43
Abb. 3.7:	Analyse LTR-flankierender Sequenzbereiche durch Inverse PCR	44
Abb. 3.8:	Amplifikation des <i>gag-pol</i> -Polyproteins von <i>Beetle1</i> in BACs der Klasse I	45
Abb. 3.9:	PCR-System zur Amplifikation eines vollständigen <i>Beetle1</i> -Retrotransposons	47
Abb. 3.10:	Amplikon-Contig über ein vollständiges <i>Beetle1</i> -Retrotransposon	47
Abb. 3.11:	Homologievergleich zwischen Amplikons aus der Reverse Transkriptase-Region von <i>Beetle1</i>	48
Abb. 3.12:	Southern-Analyse zur Identifizierung eines Restriktionsfragments, welches ein vollständiges <i>Beetle1</i> -Retrotransposon aufweist	49
Abb. 3.13:	Restriktionskarte des <i>BamHI</i> -Fragments aus dem BAC 125N12	51
Abb. 3.14:	Strukturelle Bereiche des Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i>	52
Abb. 3.15:	Sequenzvergleich zwischen 5'-LTR und 3'-LTR von <i>Beetle1</i>	53
Abb. 3.16:	Strategie zur Klonierung von <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	56
Abb. 3.17:	Strukturelle Bereiche des Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle2</i>	58
Abb. 3.18:	Sequenzvergleich zwischen 5'-LTR und 3'-LTR von <i>Beetle2</i>	59
Abb. 3.19:	Northern-Analysen mit mRNA und Gesamt-RNA verschiedener <i>Beta</i> -Arten mit spezifischen Sonden aus <i>Beetle1</i>	61

Abb. 3.20:	Amplikons aus der PCR mit cDNA aus <i>B. procumbens</i> und <i>B. vulgaris</i> unter Verwendung von <i>Beetle1</i> - und <i>Beetle2</i> - spezifischen Primern	62
Abb. 3.21:	Homologievergleich zwischen der Reverse Transkriptase-Region von <i>Beetle1</i> und der entsprechenden Sequenz aus RT-PCR mit cDNA von <i>B. procumbens</i>	62
Abb. 3.22:	DNA-Sequenzen einzelner Ty3-gypsy-Retrotransposons weisen potentielle Primerbindungsstellen für die DNA-Synthese auf	64
Abb. 3.23:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus dem <i>gag</i> -Bereich von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	66
Abb. 3.24:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der Protease-Region von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	67
Abb. 3.25:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der Region der Reversen Transkriptase von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	67
Abb. 3.26:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der RNaseH-Region von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	68
Abb. 3.27:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus dem Zinkfinger-Motiv der Integrase-Region von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	69
Abb. 3.28:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz dem DD35E-Motiv der Integrase von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	69
Abb. 3.29:	Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der zentralen Core-Region der Integrase von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons	70
Abb. 3.30:	Sequenzvergleich zwischen Chromointegrasen verschiedener LTR-Retrotransposons	70
Abb. 3.31:	Diversität von Chromodomänen	73
Abb. 3.32:	Homologiebeziehungen zwischen <i>Beetle1</i> , <i>Beetle2</i> und anderen LTR-Retrotransposons	74
Abb. 3.33:	Genomische Organisation der Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i> im Genom von <i>Beta procumbens</i>	79
Abb. 3.34:	Southern-Hybridisierung von genomischer DNA verschiedener <i>Beta</i> -Arten Sonden aus <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	81
Abb. 3.35:	Chromosomale Lokalisation von <i>Beetle1</i> -Sequenzen auf <i>Beta</i> -Chromosomen durch Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	84
Abb. 3.36:	Chromosomale Lokalisation von <i>Beetle2</i> -Sequenzen auf <i>Beta</i> -Chromosomen durch Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	85
Abb. 3.37:	Detektion von Wildrüben-Chromatin durch die LTR-Sequenzen der Ty3-gypsy-Retrotransposons <i>Beetle1</i> und <i>Beetle2</i>	87
Abb. 3.38:	Interspersion von <i>Beetle1</i> mit dem centromerischen Satellitenrepeat pTS5	88

Abb. 3.39:	BAC-Fingerprints mit dem <i>Beetle1</i> -LTR und dem pTS5-Satellitenrepeat	89
Abb. 3.40:	Nachweis der Integration von <i>Beetle1</i> in <i>Beetle2</i> durch PCR	91
Abb. 3.41:	Nachweis der <i>Beetle1</i> -Integration in Mitglieder der <i>Beetle1</i> -Familie	92
Abb. 3.42:	Rearrangierte <i>Beetle1</i> -Sequenzen	93
Abb. 3.43:	Nachweis von <i>Beetle1</i> -Elementen mit Deletionen innerhalb des <i>gag-pol</i> -Polyproteins	95
Abb. 3.44:	Graphische Darstellung und Sequenzanalyse der im <i>gag-pol</i> -Polyprotein deletierten <i>Beetle1</i> Δ -Sequenz	96
Abb. 3.45:	PCR-Analysen <i>Beetle1</i> -LTR positiver PRO1-BACs	97
Abb. 3.46:	PCR-Analysen <i>Beetle2</i> -LTR positiver PRO1-BACs	98
Abb. 3.47:	Homologievergleich abgeleiteter Aminosäuresequenzen aus der Protease-Region von Ty3- <i>gypsy</i> -Retrotransposons	99
Abb. 3.48:	Southern-Hybridisierung restringierter <i>B. procumbens</i> -DNA mit Sonden aus der Protease-Region verschiedener Ty3- <i>gypsy</i> -Retrotransposons	100
Abb. 3.49:	Dot Blot-Hybridisierung mit Ty3- <i>gypsy</i> -spezifischen Sequenzen aus BAC-Endsequenzierungen an minichromosomspezifischen PRO1-BACs	100

1. Einleitung

1.1 Transponierbare Elemente - ubiquitäre Bestandteile eukaryotischer Genome

Organismen mit ähnlicher Komplexität und evolutionärer Entwicklungsstufe haben oft stark verschieden große Genome. Dieser fehlende Zusammenhang zwischen Chromatingehalt und Komplexität wird im Allgemeinen als C-Wert-Paradoxon bezeichnet (Thomas, 1971). Die Genomgrößenunterschiede werden dabei nicht durch eine unterschiedliche Anzahl von Genen, sondern überwiegend durch nicht genische DNA verursacht, die sich vor allem aus repetitiven Sequenzen zusammensetzt.

So beruht in den *Poaceae* die enorme Variation in der Genomgröße neben Polyploidie und segmentalen Duplikationen hauptsächlich auf den Unterschieden in der Akkumulation transponierbarer Elemente (Gaut, 2002; Levy & Feldman, 2002; Kim *et al.*, 2005). Die Analyse agronomisch wichtiger Gräser zeigte, dass sich die LTR-Retrotransposon-Fraktion mit zunehmender Genomgröße erhöht (Feschotte *et al.*, 2002). Im Reis, dem kleinsten charakterisierten Grasgenom, liegt deren Anteil bei 15 % (Jiang & Wessler, 2001) und erhöht sich auf 50-80 % in Mais (SanMiguel & Bennetzen, 1998; Meyers *et al.*, 2001).

Der vielfach als „selfish DNA“ bezeichnete repetitive Genomanteil (Orgel & Crick, 1980) erfuhr vor allem durch die vollständige Sequenzierung von derzeit mehr als vierzig eukaryotischen Genomen (The Genomes On Line Database, Liolios *et al.*, 2006), wie unter anderen dem Humangenom (Venter *et al.*, 2001; Waterston *et al.*, 2003) und den Genomen von Maus (Waterston *et al.*, 2002), *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), Reis (Yu *et al.*, 2002), und Pappel (Tuskan *et al.*, 2006) zunehmendes Interesse. Die ubiquitäre Verbreitung transponierbarer Elemente in Eukaryoten wandelt das Bild einer egoistischen DNA, die sich nur selbst propagiert, sondern deutet auf einen positiven Beitrag in der Evolution des Wirtsgenoms hin (Kumar & Bennetzen, 1999).

Die Aktivität transponierbarer Elemente ist in erster Linie mit der Erhöhung der Genomgröße verknüpft (Bennetzen, 2000) und es zeigt sich zunehmend, dass sie in komplexen Pflanzen die Mehrheit des nukleären Genoms bilden (Kumar & Bennetzen, 1999; Vitte & Panaud, 2005). Zudem sind sie bedingt durch ihre Transposition und der Rekombination zwischen Elementen in der Lage chromosomale Umordnungen, wie Deletionen, Duplikationen, Inversionen und reziproke Translokationen zu induzieren (Kidwell, 2002; Garfinkel, 2005). Bereits 1949 vermutete Barbara McClintock, dass die Präsenz und Aktivität transponierbarer Elemente in der Nähe befindliche Gene kontrolliert und bezeichnete sie als „controlling

elements“. Später konnte die Beeinflussung der Genexpression durch die Transposition von Retrotransposons in Gene oder in deren Nähe vielfach gezeigt werden (Jakubczak *et al.*, 1990; Whitelaw & Martin, 2001; Bowen & Jordan, 2002).

Weiterhin wird Retrotransposons in der Ausbildung neuer Variabilitäten, sowie in der Artentstehung eine bedeutende Rolle zugesprochen (Heslop-Harrison *et al.*, 1997; Bowen & Jordan, 2002). Sowohl der Zeitpunkt, die vorherrschenden Elementtypen als auch die Amplifikationsrate von Retrotransposons üben einen großen Einfluss auf die Ausbildung der Diversität und letztendlich die Evolution des Genoms aus (Heslop-Harrison *et al.*, 1997; Bennetzen, 2000; Schulman & Kalendar, 2005). So führte nach Vitte & Panaud (2005) der durch Transposition und gleichzeitige Entfernung verursachte „Turnover“ transponierbarer Elemente im Pflanzengenom zur schnellen Differenzierung, was sich deutlich in der fehlenden Korrelation zwischen intergenischen Regionen orthologer Loci in verwandten Arten widerspiegelt (Fu & Dooner, 2002; Ma *et al.*, 2005).

Mit der Aktivität transponierbarer Elemente verknüpfte McClintock (1984) obendrein deren Reaktion auf Umweltveränderungen. Die Aktivierung pflanzlicher Retrotransposons durch Stressfaktoren wie Verwundung, Pathogenbefall oder Zellkultur wurde vielfach beschrieben (Wessler, 1996; Grandbastien, 1998; Beguiristain *et al.*, 2001). Die Induzierbarkeit des Promotors von *Tnt1*, einem Ty1-*copia*-Retrotransposon aus Tabak, durch abiotischen Stress konnte durch Mhiri *et al.* (1997) bewiesen werden.

In mehr als 30 Fällen konnte einzelnen Retrotransposons verschiedener Eukaryoten eine funktionelle Rolle zugeordnet werden. Diese Genomfunktionen reichen von Transkription, RNA-Prozessierung über DNA-Replikation bis hin zur Chromatinorganisation und epigenetischen Modifikation (zusammengefasst in: von Sternberg & Shapiro, 2005). So wurden Sequenzen transponierbarer Elemente in fast einem Viertel der Promotorsequenzen im Humangenom identifiziert (Jordan *et al.*, 2003). Die Non-LTR-Retrotransposons HeT-A und TART transponieren in *Drosophila melanogaster* in die Chromosomenenden und sorgen dort anstelle einer Telomerase für den Erhalt der Telomere (Pardue *et al.*, 2005). Innerhalb der Gräser ist die Centromer-Region durch konservierte LTR-Retrotransposons charakterisiert, was auf eine funktionelle Rolle dieser Elemente in der Kinetochorausbildung hinweist (Hudakova *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Nagaki *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004). Lippman *et al.* (2004) zeigte, dass in *Arabidopsis thaliana* das interstitielle Heterochromatin vor allem durch die Interaktion von Retroelementen mit Chromatin-modifizierenden Enzymen gebildet wird.

1.1.1 Klassifizierung von transponierbaren Elementen

Transponierbare Elemente (engl. *transposable elements*, TEs) sind DNA-Elemente, die durch einen als Transposition bezeichneten Vorgang an eine andere Stelle des Genoms versetzt (transponiert) werden. In Eukaryoten lassen sich diese mobilen DNA-Sequenzen in die Klasse I und Klasse II einteilen, abhängig davon ob ihr Transpositions-Intermediat ein RNA- oder DNA-Molekül ist. Dabei weisen beide Klassen sowohl autonome als auch nicht-autonome Mitglieder auf. Autonome DNA-Elemente besitzen offene Leseraster (*open reading frames*, ORFs), welche für die für die Transposition notwendigen Proteine kodieren. Nicht-autonome Vertreter können sich trotz fehlender Kodierungskapazität mit Hilfe der Proteinkomponenten autonomer Elemente im Genom bewegen.

DNA-Transposons transponieren meist durch einen nichtreplikativen Mechanismus durch Ausschneiden und direktes Reintegrieren („*cut and paste*“) eines DNA-Intermediates. Sie werden von terminalen invertierten Sequenzwiederholungen (*terminal inverted repeats*, TIRs) flankiert und zeichnen sich innerhalb einer Familie durch konservierte Zielsequenzverdopplungen (*target site duplication*, TSD) aus (Feschotte *et al.*, 2002). In Pflanzen werden mehrere Überfamilien von DNA-Transposons unterschieden, die nach den zuerst in Mais beschriebenen Familien *Activator/Dissociation* (*Ac/Ds*), *Enhancer/Suppressor-Mutator* (*En/Spm*) und *Mutator* (*Mu*) benannt werden (Kunze *et al.*, 1997). Weiterhin konnten in Pflanzen *Mariner*-ähnliche Elemente (MLEs, *mariner-like elements*) nachgewiesen werden (Feschotte & Wessler, 2002), die Derivate der im Tierreich weit verbreiteten *Tc1/mariner* – Transposons darstellen (Capy *et al.*, 1998). Die durch eine „rolling circle“-Replikation transponierenden Helitrons zählen zu einer neuen, erst seit wenigen Jahren bekannten Kategorie eukaryotischer DNA-Transposons, die bereits in *Arabidopsis thaliana* und Reis identifiziert werden konnte (Kapitonov & Jurka, 2001).

Retrotransposons transponieren durch Reverse Transkription eines RNA-Intermediats (Boeke & Corces, 1989) und gehören mit den Retroviren zu den Retroelementen. Ihr replikativer Transpositionsmechanismus („*copy and paste*“) führt bei jeder Transposition im Genom zu einer Erhöhung der Kopienzahl (SanMiguel & Bennetzen, 1998). Auch hier lassen sich abhängig von Struktur und Transpositionsmechanismus zwei Gruppen unterscheiden: LTR-Retrotransposons und Non-LTR-Retrotransposons.

LTR-Retrotransposons werden von langen terminalen Sequenzwiederholungen (*long terminal repeats*, LTRs) in direkter Orientierung flankiert und sind strukturell eng mit den Retroviren verwandt. Die LTRs werden von der kurzen konservierten inversen Sequenz 5'-TG...CA-3'

begrenzt und sind, da sie regulatorische Sequenzen für die Promotion und Termination der Transkription enthalten, funktionell von großer Bedeutung. Im zentralen Teil des Elements befinden sich ORFs, die für die strukturellen und enzymatischen Proteinkomponenten kodieren. Meist wird in einem separaten ORF das *gag* (*groupspecific antigene*)-Protein kodiert, das als Kapsid-Strukturprotein die Bildung von virusähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLPs) unterstützt. Protease, Reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase werden in Form eines einzigen komplexen Multidomänenenzym dem sogenannten Polyprotein (*pol*) exprimiert. Abhängig von der Reihenfolge der Polyproteingene und dem Grad der Sequenzhomologie (Xiong & Eickbush, 1990) werden zwei Familien der LTR-Retrotransposons unterschieden. Die Ty3-*gypsy*-Retrotransposons weisen die gleiche Anordnung im Polyprotein (Protease, Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase) wie die Retroviren auf. Bei den Ty1-*copia*-Retrotransposons liegt die Integrasefunktion stromaufwärts der Reversen Transkriptase. Zwischen den LTRs und der kodierenden Region liegen mit der Primerbindestelle (*primer binding site*, PBS), die komplementär zum 3'-Ende zellulärer tRNAs (z. B. tRNA_i^{Met}, tRNA_i^{Asp}, tRNA_i^{Glu}) ist, und einer purinreichen Sequenz (Polypurintrakt, PPT) kurze Sequenzbereiche vor, die während der reversen Transkription als Primerbindestellen dienen.

Non-LTR-Retrotransposons, zu denen die LINEs (*long interspersed nuclear elements*) und SINES (*short interspersed nuclear elements*) gehören, weisen keine begrenzenden LTRs auf, sondern besitzen am 3'-Ende einen poly(A)-Abschnitt. Die autonomen LINEs besitzen zwei interne ORFs, die für *gag*-Protein bzw. für die Endonuklease, Reverse Transkriptase und RNaseH (*pol*) kodieren. Bei den SINES handelt es sich um einen nicht-autonomen Retrotransposontyp, der nur wenige hundert Basenpaare lang ist und durch LINE-kodierte Proteinkomponenten repliziert und integriert wird (Kumar & Bennetzen, 1999).

Das hauptsächliche Unterscheidungsmerkmal zwischen den Retrotransposons und den Retroviren liegt in der Ausbildung eines Hüllproteins (*envelope*, *env*), welches die Retroviren zur Formierung extrazellulärer Virionen befähigt und deren Verbreitung von Zelle zu Zelle ermöglicht. Die Entdeckung, dass der Erwerb eines zusätzlichen *env*-ähnlichen Leserahmens LTR-Retrotransposons zur Infektiösität befähigen kann, macht strukturelle und funktionelle Grenzen fließend (Malik *et al.*, 2000).

Nach der ICTV (International Committee on Viral Taxonomy)-Definition eines Virus und auf Grund gemeinsamer phylogenetischer Merkmale lassen sich die Retroelemente in die virale Nomenklatur einordnen (Hull, 2001; Abb. 1.1).

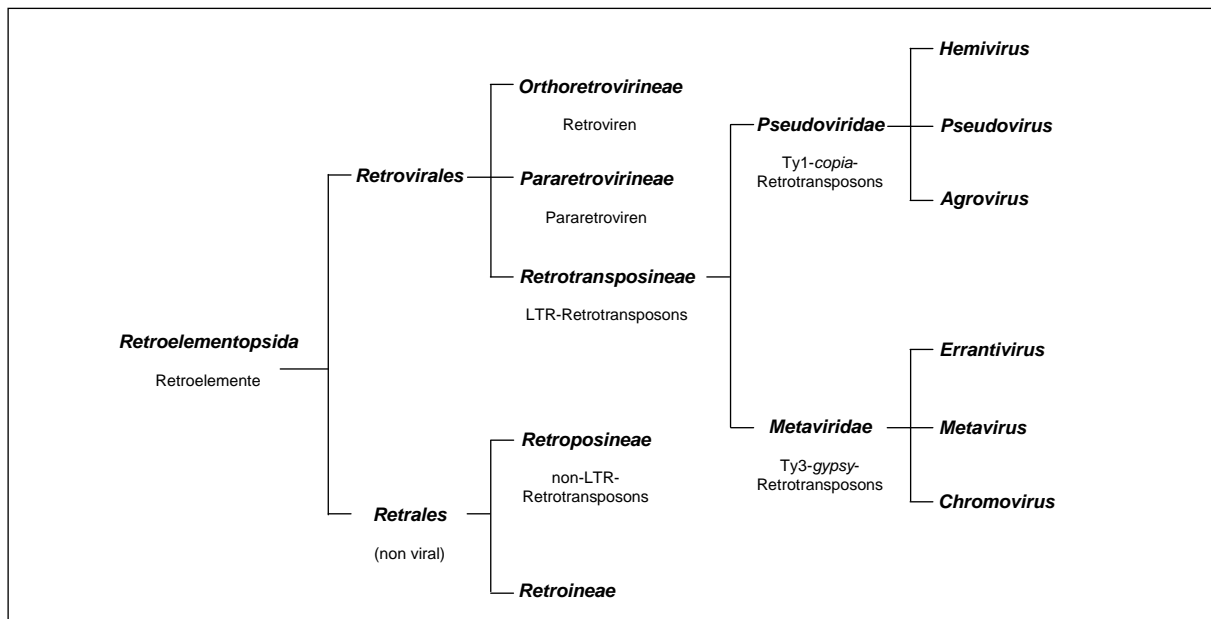


Abb. 1.1: Klassifizierung von Retroelementen mit Schwerpunkt auf LTR-Retrotransposons in Pflanzen
 Die Klassifizierung ist modifiziert nach Hull (2001) und Hansen & Heslop-Harrison (2004). In kursiver Schreibweise ist die virale Taxonomie aufgeführt. Zur Orientierung befindet sich darunter der entsprechende Begriff nach der klassischen Definition der Retroelemente (zusammengefasst in: Capy *et al.*, 1998).

Die *Retroelementopsida* (Abb. 1.1) umfassen neben den *Retrales* genannten nicht-viralen Retroelementen mit den *Retrovirales* die Gruppe der DNA- und RNA-Viren. Die Präsenz *env*-ähnlicher Leseraster in zahlreichen pflanzlichen Retrotransposons lässt die LTR-Retrotransposons in die Gruppe der *Retrovirales* einordnen (Hansen & Heslop-Harrison, 2004). Die nach dieser Klassifizierung *Retrotransposineae* genannten LTR-Retrotransposons beinhalten die Familie der *Pseudoviridae* und der *Metaviridae*.

Die *Pseudoviridae* (Ty1-*copia*-Retrotransposons) werden weiter in *Pseudoviren* (*Saccharomyces cerevisiae* Ty1-Element als Vertreter) und Hemiviren (*Drosophila melanogaster copia*-Element als Vertreter) unterteilt (Hull, 2001). Die Entdeckung von pflanzlichen *Pseudoviridae* mit zusätzlichem *env*-ähnlichen Leseraster (Laten *et al.*, 1998; Laten, 1999) führte zur Bildung einer dritten Gruppe, den *Agroviren* (Peterson-Burch & Voytas, 2002).

Die *Metaviridae* lassen sich durch die Präsenz eines *env*-ähnlichen Leserasters in *Errantiviren* (*Drosophila melanogaster gypsy*-Element als Vertreter) oder dessen Abwesenheit in *Metaviren* (*Saccharomyces cerevisiae* Ty3-Element als Vertreter) einteilen. Eine Vielzahl von *Errantiviren* wurden in Pflanzen beschrieben (Chavanne *et al.*, 1998; Peterson-Burch *et al.*, 2000; Wright & Voytas, 2001; Vicient *et al.*, 2001), jedoch wurden infektiöse Mitglieder von LTR-Retrotransposons bisher nur in Insekten gefunden (Kim *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1994). Malik & Eickbush (1999) identifizierten Mitglieder innerhalb der *Metaviren*, die in ihrer

Integrase-Region eine zusätzliche Chromodomäne aufwiesen. Spätere phylogenetische Studien gruppieren diese *Metaviridae* als eigenständige Gruppe, die als *Chromoviren* bezeichnet wird (Marin & Llorens, 2000).

1.1.2 Reverse Transkription von LTR-Retrotransposons

Die reverse Transkription von LTR-Retrotransposons ist ein komplexer Prozess, der entgegen des Mechanismus bei den Non-LTR-Retrotransposons von der Insertion räumlich und zeitlich entkoppelt in den VLPs stattfindet (Kumar & Bennetzen, 1999; Goff, 2001).

Das LTR-Retrotransposon wird in fast voller Länge durch die zellulär kodierte RNA-Polymerase II vom Promotor innerhalb des 5'-LTR transkribiert (Havecker *et al.*, 2004). Damit wird sowohl die RNA für die kodierenden Komponenten als auch ein RNA-Template für eine weitere Kopie erzeugt. Dem Transposon-Transkript fehlen lediglich neben der U3-Region (*unique 3'-region*) des 5'-LTRs die U5-Region (*unique 5'-region*) des 3'-LTRs. Dies beruht auf der Lage des Transkriptionsstarts im 5'-LTR zwischen U3- und R-Region (*repeated RNA region*) und der Lage des Transkriptionsendes im 3'-LTR zwischen R- und U5-Region.

Die Reverse Transkription wird durch die Anlagerung einer häufigen zellulären RNA-Art, meist einer t-RNA, an das RNA-Intermediat initialisiert (Abb.1.2 A). Dieses RNA-DNA-Hybridmolekül wird durch die Reverse Transkriptase in 5'→3'-Richtung verlängert und bildet den komplementären Strang. Die Transposon-kodierte RNaseH baut den RNA-Anteil des Hybrids ab (Abb.1.2, B), bevor durch Umlagerung über die komplementären R-Regionen im LTR (Abb.1.2, C) die DNA-Synthese des Gegenseinstrangs erfolgt (Abb.1.2, D).

Die Synthese des zweiten DNA-Strangs erfolgt mit Hilfe der zweiten Primerbindestelle (PPT) nach Entfernung der Template-RNA (Abb.1.2, E) durch die RNaseH. Der PPT ist zunächst gegen den Abbau durch die Ribonuklease resistent, wird jedoch nach 5'→3'-Polymerisation des Sinnstrangs, wie die nicht mehr benötigte tRNA eliminiert (Abb.1.2, F). Durch erneute Dissoziation und Reassoziierung über identische Bereiche innerhalb der LTR-Sequenzen erfolgt die Rekonstruktion der im primären Transkript unvollständigen LTR-Bereiche in Form eines zirkulären Intermediates (Abb.1.2, G). Dieser Prozess führt zu einem doppelsträngigen cDNA-Molekül, das die komplette Sequenz des LTR-Retrotransposons repräsentiert (Abb.1.2, H).

Eine Integrase-Aktivität fügt die cDNA durch einen versetzten Doppelstrangsschnitt in einen neuen genomischen Locus ein. Die Reparaturmechanismen der Zelle führen schließlich zur typischen Zielsequenzverdoppelung.

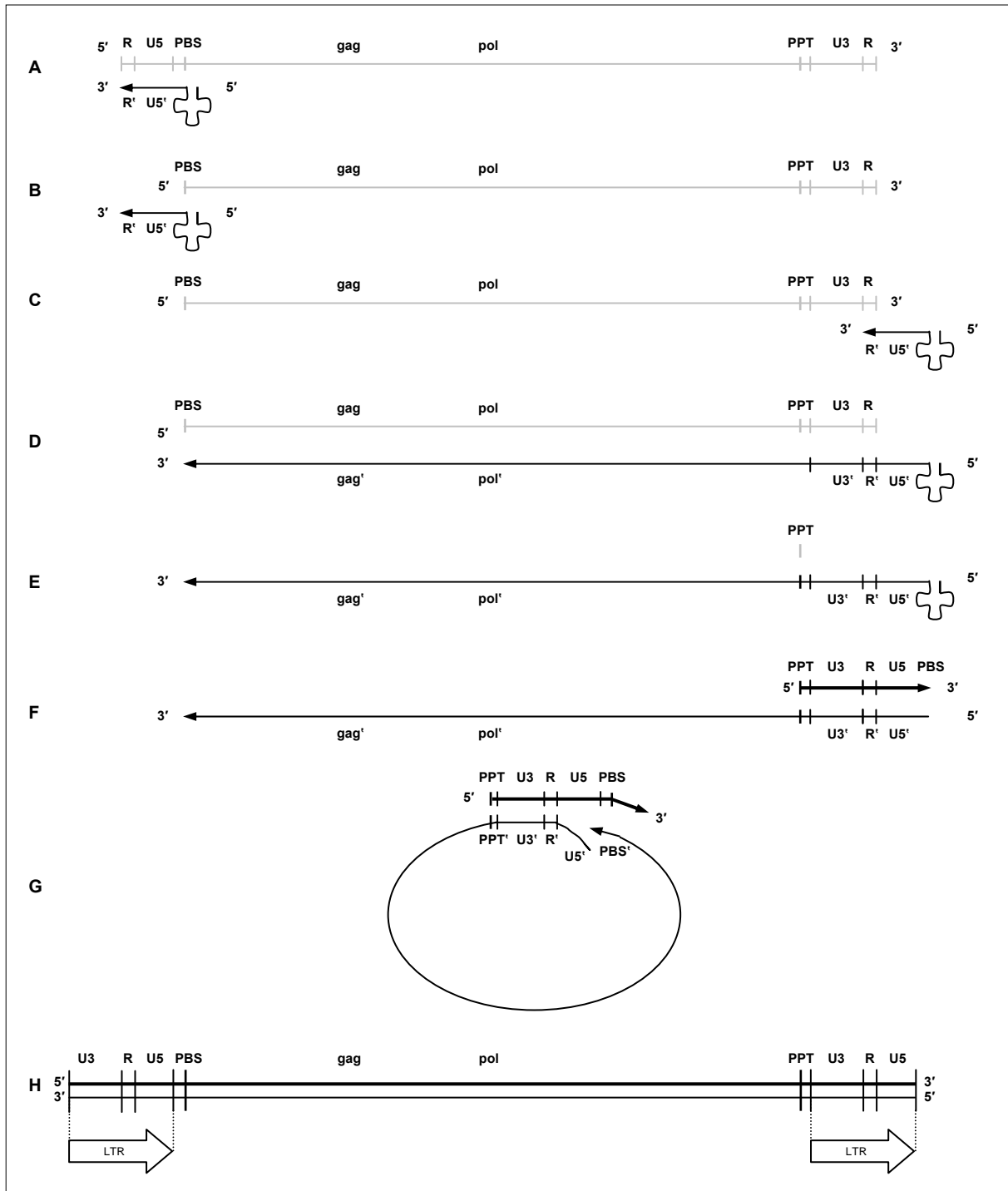


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Reversen Transkription eines LTR-Retrotransposons, modifiziert nach Götte *et al.* (1999) und Goff (2001)

Anhand ihrer Farbe sind RNA-Transkript (grau) und synthetisierte DNA (schwarz) zu unterscheiden. A) Dem Retrotransposon-Transkript fehlt ein Teil des 5'-LTR, da der Transkriptionsstart zwischen U3- und R-Region liegt. Zudem fehlt ein Teil des 3'-LTR, da das Transkript zwischen R- und U5-Region endet. An die Primerbindestelle (PBS) bindet eine zelluläre tRNA und die reverse Transkription des Gegensinnstrangs beginnt. B) Abbau des RNA-Anteils des RNA-DNA-Hybrids durch die RNaseH. C) Dissoziation und Reassoziierung von mRNA- und cDNA-Strang D) DNA-Polymerisation des Gegensinnstrangs. E) Abbau des RNA-Anteils durch die RNaseH, lediglich der Polypurintrakt (PPT) bleibt bevorzugt erhalten. F) Der PPT dient als Primer für die cDNA-Doppelstrang-Synthese. Die tRNA und der PPT-Anteil der Rest-mRNA werden später abgebaut G) Erneute Dissoziation und Reassoziierung der Stränge in Form eines zirkulären Intermediates. Es erfolgt die Kompletierung des cDNA-Doppelstrangs, der vollständige LTR-Bereiche enthält (H).

1.1.3 Regulierung der Transposition

Trotz der Identifizierung diverser Retrotransposon-Sequenzen in mehr als 100 Pflanzenarten (Flavell *et al.*, 1992; Hirochika & Hirochika, 1993; Voytas *et al.*, 1992) und der vollständigen Charakterisierung von mehr als 150 LTR-Retrotransposon-Familien sowohl in monokotylen als auch dikotylen Pflanzen (Vitte & Panaud, 2005), wurden mit *Tnt1* und *Tto1* aus Tabak und *Tos17* aus Reis bisher nur drei Retrotransposons identifiziert, für die jedoch auch nur unter bestimmten Bedingungen die Transposition nachgewiesen wurde (Grandbastien *et al.*, 1989; Pouteau *et al.*, 1991; Hirochika, 1993; Hirochika *et al.*, 1996). Erst biotische und abiotische Stressfaktoren induzieren die Transkription und Transposition dieser LTR-Retrotransposons (Grandbastien, 1998), was auf eine Regulation der Transposition auf Transkriptionsebene deutet (Sugimoto *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass die transkriptionelle Aktivität von transponierbaren Elementen epigenetisch, also ohne eine Beeinflussung der Nukleotidabfolge, durch Methylierung oder eine bestimmte Chromatinstruktur reguliert wird (McDonald *et al.*, 2005).

Das dicht gepackte Heterochromatin setzt sich aus langen Bereichen repetitiver Nukleotidsequenzen und transponierbaren Elementen zusammen und wird generell als transkriptionell inaktiv angesehen (Madlung & Comai, 2004). Diese rekombinationsarme Region liegt sowohl in Säugetieren als auch in Pflanzen stark methyliert vor (Avramova, 2002). Methylierungs-defiziente Mutanten unterschiedlicher Arten sowohl aus dem Pflanzen- als auch aus dem Tierreich zeigen, dass die DNA- und Histon-Methylierung für die Formation und den Erhalt des Heterochromatinstatus notwendig ist (Volpe *et al.*, 2002; Madlung & Comai, 2004). Ein Verlust der Methylierung führt zur Aktivierung der Transkription transponierbarer Elemente (Singer *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2001, 2004; Lippman *et al.*, 2003).

Der als RNA-Interferenz (RNAi) bekannte sequenzspezifische Stilllegungs-Mechanismus (Fire *et al.*, 1998) verursacht im Zellkern die DNA-Methylierung homologer DNA-Sequenzen und kann dabei auch zur Repression der Transkription transponierbarer Elemente führen (Hamilton *et al.*, 2002). Analysen in Spaltheife, *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass der durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöste RNAi-Reaktionsweg die Methylierung von Histon H3 und die Chromatinkondensation bedingt. Dabei geht diese Heterochromatisierung mit der Stilllegung transponierbarer Elemente einher. (Volpe *et al.*, 2002; Pal-Bhadra *et al.*, 2002, 2004; Schramke & Allshire, 2003; Zilberman *et al.*, 2003)

Im Cytoplasma führt dsRNA zur sequenzspezifischen RNA-Degradation. Für *C. elegans* konnte dieser post-transkriptionelle RNA-Degradationsmechanismus direkt mit der Abwehr transponierbarer Elemente verknüpft werden (Ketting *et al.*, 2003; Sijen & Plasterk, 2003).

Ein weiterer Aspekt der Transkriptionsinaktivität liegt in der hohen Mutationsrate, die mit der Retrotransposition verbunden ist (Dixit *et al.*, 2006). Die fehlende *proofreading*-Aktivität der Reversen Transkriptase (Domingo & Holland, 1994) führt dazu, dass die Mehrheit der Retroelemente durch Stopcodons sowie Veränderungen im Leseraster nicht zur Kodierung funktioneller Polyproteine in der Lage sind (Suoniemi *et al.*, 1998). Dennoch sind einige wenige funktionelle Kopien für die Verbreitung im Genom ausreichend (Vitte & Panaud, 2005; Ma & Bennetzen, 2006).

LTR-Retrotransposons unterliegen überdies Rekombinationen, die zu verschiedenen inter- und intraelementaren Umordnungen und den Verlust von DNA-Sequenzen führen (Devos *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004; Bennetzen *et al.*, 2005). Durch ungleiche homologe Rekombination kann es innerhalb eines Retrotransposons zur Eliminierung interner Sequenzbereiche und zur Formation einzelner LTR-Sequenzen kommen, die als Solo-LTRs bezeichnet werden. Weiterhin führt die illegitime Rekombination zwischen verschiedenen Retroelementen zur Bildung deletierter Kopien. Da diese Mechanismen mit einer Verminderung aktiver Retrotransposonkopien einhergehen, kann die Zahl der Transpositionseignisse im Wirtsgenom weitgehend reguliert werden (Vitte & Panaud, 2003).

1.2 Die Gattung *Beta*

Die Gattung *Beta* gehört zur Familie der *Chenopodiaceae* und wird in die vier Sektionen *Beta*, *Corollinae*, *Nanae* und *Procumbentes* unterteilt (Barocka, 1985; Tab. 1.1). Die Art *Beta vulgaris* mit ihren mannigfaltigen Kulturformen (Zuckerrübe, Futterrübe, Gartenrübe, Blattrübe, Blattmangold, Stielmangold, Rote Beete) wird der Sektion *Beta* zugeordnet (Tranzschel, 1927; Ulbrich, 1934; Lange *et al.*, 1999).

Das Genom der Zuckerrübe besitzt einen diploiden Chromosomensatz ($2n=18$) und eine Größe von 758 Mbp (Arumuganathan & Earle, 1991). Aufgrund des relativ kleinen Genoms und der Bedeutung als Kulturpflanze stellt *B. vulgaris* einen geeigneten Modellorganismus zur Analyse der Genomstruktur dar, der seit längerem intensiv durch molekularbiologische Methoden untersucht wird.

Tab. 1.1: Taxonomie und Chromosomenzahl (2n) der Gattung *Beta*

Sektion	Art/Unterart	2n
<i>Beta</i>	<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	18
	subsp. <i>adanensis</i>	18
	subsp. <i>maritima</i>	18
	<i>B. macrocarpa</i>	18
	<i>B. patula</i>	18
Corollinae	<i>B. corolliflora</i>	36
	<i>B. lomatogona</i>	18
	<i>B. macrorhiza</i>	18
	<i>B. intermedia</i>	18
	<i>B. trigyna</i>	54
<i>Nanae</i>	<i>B. nana</i>	18
<i>Procumbentes</i>	<i>B. procumbens</i>	18
	<i>B. webbiana</i>	18
	<i>B. patellaris</i>	36

Eine Vielzahl an repetitiven DNA-Familien, wie Satelliten-DNA, Mikrosatelliten, DNA-Transposons und Retrotransposons wurde sowohl in kultivierten Arten als auch in Wildarten der Gattung *Beta* charakterisiert, die gattungs-, sektions- oder artspezifischen Charakter aufweisen (Schmidt *et al.*, 1990, 1991, 1998; Schmidt & Metzlaß, 1991; Schmidt & Heslop-Harrison, 1993, 1996; Kubis *et al.*, 1997; Gindullis *et al.*, 2001b; Dechyeva *et al.*, 2003; Dechyeva & Schmidt, 2006; Menzel *et al.*, 2006).

Die physikalische Kartierung von Ty3-gypsy-Sequenzen in *B. vulgaris* und *B. procumbens* zeigte, dass sie hochamplifizierte DNA-Sequenzen dieser *Beta*-Genome sind und wesentliche Komponenten der centromerischen DNA darstellen (Gindullis *et al.*, 2001b). Für die molekulare Identifizierung der Centromer-DNA stehen monosome Additionslinien zur Verfügung, die aus Kreuzungen zwischen der Zuckerrübe und Wildrüben mit nachfolgender Rückkreuzung selektiert wurden (Brandes *et al.*, 1987; Jung & Wricke, 1987). Die monosome Additionslinie PRO1 besitzt ein sehr kleines Chromosomenfragment aus der Wildrübe *Beta procumbens*, welches auch im genetischen Hintergrund von *Beta vulgaris* aktiv ist. Aufgrund seiner stabilen Segregation kann dieses Chromosomenfragment als Minichromosom bezeichnet werden.

Mit der Erstellung einer genomischen BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Bank von PRO1 ist die gezielte molekulare Analyse eines einzelnen Wildrüben-Centromers möglich und ein geeignetes System für die Aufklärung der komplex strukturierten Centromer-Region in *Beta procumbens* gegeben (Gindullis *et al.*, 2001a).

1.3 Zielstellung der Arbeit

Auf dem Gebiet der grundlagenorientierten Genomanalyse ergeben sich durch die zunehmende Zahl an Genom-Sequenzierungsprojekten fundamentale Einsichten in die Organisationsprinzipien, strukturellen Hierarchien, Amplifikations- und Evolutionsmechanismen der repetitiven DNA pflanzlicher Genome.

Die molekulare Analyse von Centromersequenzen ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis des pflanzlichen Genoms, seiner Chromosomenarchitektur und strukturellen Sequenzorganisation. Der Nachweis von Ty3-gypsy-Retrotransposons an den Centromeren von *Beta*-Arten (Gindullis *et al.*, 2001b) stimmt mit Befunden in der *Poaceae*-Familie überein (Hudakova *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Nagaki *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2004; Nagaki & Murata, 2005) und zeigt Parallelen in der Centromerstruktur zwischen monokotylen und dikotylen Pflanzen. Dadurch wirft sich die Frage auf, ob Ty3-gypsy-Retrotransposons in Pflanzen funktionelle Centromersequenzen sind oder ihre Anwesenheit das Ergebnis von Transpositionsinaktivität und Akkumulation in der rekombinationsarmen Centromer-Region ist.

Die im Rahmen der Dissertation durchzuführenden Arbeiten sollten zur Strukturanalyse von Ty3-gypsy-Retrotransposons aus der Centromer-Region des PRO1-Minichromosoms führen. Dazu sollten mit den *Procumbentes*-spezifischen Satellitenrepeats pTS5 und pTS4.1 BACs aus der PRO1 BAC-Bank selektiert werden, die Sequenzen aus der Centromer-Region des PRO1-Minichromosoms enthalten.

Neben der Isolation und molekularen Charakterisierung eines vollständigen Ty3-gypsy-Retrotransposons sollte dessen Aktivität untersucht werden. Durch die Betrachtung der Integrationsorte und Subfamilienstruktur sollten sich Einblicke in die genomische Organisation dieses transponierbaren Elements ergeben. Die chromosomale Organisation des isolierten Ty3-gypsy-Retrotransposons sollte durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, einer Technologie die eine eindeutige räumliche Zuordnung zu bestimmten Regionen des Chromosoms ermöglicht, analysiert werden. Weiterhin sollten Kenntnisse über die Abundanz von Ty3-gypsy-Retrotransposons am Centromer des PRO1-Minichromosoms erlangt werden, woraus sich Schlußfolgerungen über deren strukturellen Einfluss in dieser Region ergeben. Untersuchungen, welche die Verbreitung von Ty3-gypsy-Retrotransposons innerhalb der Gattung *Beta* erforschen, sollten die Evolution dieser repetitiven Sequenzen fokussieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Kits und ihre Bezugsquellen

Die benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle A1 bzw. A2 im Anhang aufgeführt. Lösungen wurden mit vollentsalztem (VE) Wasser hergestellt und bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

Tab. 2.1: Größenstandards und ihre Bezugsquellen

Marker	Hersteller
1 kb DNA-Marker	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
GeneRuler 100 bp Ladder Plus	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
RNA-Marker, High Range	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Low Range PFG Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main

Tab. 2.2: Enzyme und ihre Bezugsquellen

Enzym	Hersteller
Cellulase (<i>Aspergillus niger</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cellulase (Onozuka R-10)	Serva Feinchemikalien, Heidelberg
Cytolhelicase (<i>Helix pomatia</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calf Intestine Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Shrimp Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Lysozym	Serva Feinchemikalien, Heidelberg
Pectolyase (<i>Aspergillus japonicus</i>)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Pektinase (<i>Aspergillus niger</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Plasmid Safe ATP-abhängige DNase	Epicentre Technologies, Madison, USA
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
RNase A	Amersham Biosciences, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Biosciences, Freiburg
T4 DNA-Ligase	Amersham Biosciences, Freiburg

Zur hydrolytischen Spaltung von 3'-5'-Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II (MBI Fermentas) verwendet.

Tab. 2.3: Kits und ihre Bezugsquellen

Produkt	Funktion	Hersteller
CEQ™DTCS Quick Starter Kit	Sequenzreaktion (CEQ 8000)	Beckman Coulter, Krefeld
Expand High Fidelity PCR System	PCR mit Pfu/Taq-Polymerase-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Expand Long Template PCR System	PCR zur Amplifikation großer Fragmente	Roche Diagnostics, Mannheim
GFX™ Micro-Plasmid Prep Kit	Plasmidaufreinigung	Amersham Biosciences, Freiburg
iScript™cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	BioRad Laboratories GmbH, München
Nucleo Bond Bac 100	BAC-Plasmidaufreinigung	Macherey & Nagel, Düren
Nucleo Spin Extract Kit	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	Macherey & Nagel, Düren
Oligotex® mRNA Mini Kit	Aufreinigung von mRNA	Qiagen GmbH, Hilden
Qiafilter™ Plasmid Midi Kit	Plasmidaufreinigung	Qiagen GmbH, Hilden

Tab. 2.4: Plasmidvektoren und Bakterienstämme

Vektor/ Stamm	Antibiotikaresistenz	Anwendung	Hersteller
pBeloBAC11	Chloramphenicol	Klonierung von großen Restriktionsfragmenten	Woo <i>et al.</i> , 1994
pGEM-T®	Ampicillin	Klonierung von PCR-Fragmenten	Promega Corporation, Madison, USA
pUC18	Ampicillin	Klonierung von Restriktionsfragmenten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Elektromax DH10B™		Vermehrung von single copy-Plasmiden	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SURE ^R electroporation competent cells	Tetracyclin	Vermehrung von high copy-Plasmiden	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.2 Kulturmedien und AntibiotikaLuria-Bertani (LB) Flüssigmedium

Bacto-Trypton (w/v)	1	%
Hefeextrakt (w/v)	0,5	%
NaCl (w/v)	1	%

LB-Agarplatten

LB-Flüssigmedium mit 1,5 % Agar

LB-Indikatorplatten

LB-Agarplatten mit IPTG	0,5	mM
x-Gal	0,004	%

LB-Freezing-Medium

Bacto-Trypton (w/v)	1	%
Hefeextrakt (w/v)	0,5	%
NaCl (w/v)	1	%
K ₂ HPO ₄	36	mM
KH ₂ PO ₄	13,2	mM
NaCitrat	1,7	mM
MgSO ₄	0,4	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,8	mM
Glycerin	4,4	Vol %

Antibiotika

Ampicillin	100	µg/ ml Medium
Tetracyclin	5	µg/ ml Medium
Chloramphenicol	12,5	µg/ ml Medium

SOC-Medium

Bacto-Trypton (w/v)	2	%
Hefeextrakt (w/v)	0,5	%
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
MgCl ₂	10	mM

pH 7,0

→ autoklavieren; Zugabe von

MgSO ₄	10	mM
Glucose	20	mM

→ sterilfiltrieren und bei -20 °C in 1 ml Aliquots lagern

2YT-Flüssigmedium

Bacto-Trypton (w/v)	2	%
Hefeextrakt (w/v)	0,5	%
NaCl (w/v)	0,5	%

2.1.3 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.5 und 2.6 aufgeführten Oligonukleotide wurden für die PCR-Analyse, Sequenzierung, Sonden-Erstellung und Sonden-Markierung eingesetzt. Die Lage der retrotransposon-spezifischen Oligonukleotide (Tab. 2.6) ist in den Abbildungen relativ zur Retrotransposonstruktur und in den Primerkarten A3 (*Beetle1*) und A4 (*Beetle2*) im Anhang dargestellt.

Tab. 2.5: Primerbezeichnung, Sequenz und Annealing-Temperatur allgemeiner und Repeat-spezifischer Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Sequenz (5'→3')	Annealing-Temperatur
M13_rev	GGA AAC AGC TAT GAC CATG	56 °C
M13_for	GTA AAA CGA CGG CCA GT	56 °C
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	56 °C
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	48 °C
pTS5 for	TTG ATC CAA GGC TTA GTA TGC	58 °C
pTS5 rev	AAC TAT CAT AGT ATC TTA CGA G	58 °C
pTS4.1 for	TGG AAC CTT AAC ATG CCG AAA ATC	58 °C
pTS4.1 rev	GGG GCG TTA GTA ATA GTC CAC CAA	58 °C
5S for	GGG TGC GAT CAT ACC GGC ACT	56 °C
5S rev	GGG GTG CAA CAC GAG GAC TT	56 °C

Tab. 2.6: Primerbezeichnung, Sequenz und Annealing-Temperatur Retrotransposon-spezifischer Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Sequenz (5'→3')	Annealing-Temperatur
Beetle1_LTR for	CAG AAT TTA TAC GGT TTG TTT AG	58 °C
Beetle1_LTR rev	ATG ATT GAG GGA TTC TGA G	54 °C
iPCRbeetle for	GTG ATG CAT GTA TGG TTG CC	58 °C
iPCRbeetle rev	CAT TTC TTT GAG CTG TGC GC	58 °C
Beetle1_PBS for	CAT CAT TTG GTA TCA GAG C	54 °C
Beetle1_PBS rev	CTC TGA TAC CAA ATG ATG C	54 °C
Beetle1_UTR for	AAG AGC ATT CTT TTA ACC C	52 °C
Beetle1_UTR rev	GTT GTA TCA AAT ATT AGA GG	52 °C
Beetle1_gag for	CCT TGA GAA TCA AAT GGC	52 °C
Beetle1_gag rev	TCA TAC TCC TTT AGC TCG	52 °C
Beetle1_Protease for	GGA GAT GAT CAT CTT AGC	52 °C
Beetle1_Protease rev	TGA CAT GCA TTC ATA GGC	52 °C
Beetle1_RVT for	GAT GAA TGG AAA ACA GCC	52 °C
Beetle1_RVT rev	ACA CTT CTC CAT CTT TGC	52 °C
Beetle1_RNaseH for	CAG GAG ATT CAT CAG AGG	54 °C
Beetle1_RNaseH rev	CAA GGC ACG AAC AAT AGC	54 °C
Beetle1_Integrase for	GCT CAC TAA GGG ATT TGC	52 °C
Beetle1_Integrase rev	CAT CAT CCG TCT TGT TGC	54 °C
Beetle1_PPT for	GAT GGG CAA CAT TTC GGC	56 °C
Beetle1_PPT rev	TGC ATC ATT CTC CCC TGG	56 °C
Beetle2_LTR for	CAA CCA TTG GAG ATG AGC	54 °C
So-Beetle2_LTR for	GAA CTA GCT TGA AAT GGC	52 °C
So-Beetle2_LTR rev	AAT GGC GTA CAT AGC TCC	54 °C
Beetle2_PBS for	TCA ATT GGT ATC AGA TTT CC	54 °C
Beetle2_PBS rev	TCC TGG AAA TCT GAT ACC	52 °C
Beetle2_PBS rev2	AAT CTG ATA CCA ATT GAT ATG	54 °C
Beetle2_UTR for	AAT ATG TGA TGT ACT TTC GG	54 °C
Beetle2_UTR rev	TTA GTT AGT CTA ATA GTG GC	54 °C
So-Beetle2_UTR for	GAT GAT TTT GAT GGT AAT GC	54 °C
So-Beetle2_UTR rev	ATC AAC CTT ATC CCT TAG C	54 °C
Beetle2_gag for	TTA TGC TTG CTA TGT GGG	52 °C
Beetle2_gag rev	TTC TCT CTA GAA ACC ACC	52 °C
Beetle2_Protease for	GGA TGA AGA TGC CTA TGC	54 °C
Beetle2_Protease rev	CAA GAA GAA CAT GAC AAG C	54 °C

Primerbezeichnung	Sequenz (5'→3')	Annealing-Temperatur
Beetle2_RVT for	GTC TAT ATG AGT GGA TGG	52 °C
Beetle2_RVT rev	TGG ATC AAC ATG TAC TCC	52 °C
Beetle2_RNaseH for	CTT CTC AAC AGT TAT GGC	52 °C
Beetle2_RNaseH rev	GCC TTA AAT AGT GAG ACC	52 °C
Beetle2_Integrase for	ATG GCA TGT ATG TAG TGC	52 °C
Beetle2_Integrase rev	TTG AGT TCT AGG CAA CCC	54 °C
Beetle2_PPT for	ATT CTT TTG AAG AGG GGG	52 °C
Beetle2_PPT rev	CTC TTC AAA AGA ATT TGT CC TTA	52 °C
110G22_PBS for	TGG TAT CAG ATT TCC AGG	52 °C
110G22_LTR rev	AAT ATG GCT CTA TGA AAG C	52 °C
97B8_SP6 for	GCA ATC TGA TAA AGA TAC CG	56 °C
97B8_SP6 rev	AAG GAC TAA GAC TTC TTG C	54 °C
125N12_T7 for	GAA GAT GAG AGA TGG TGC	54 °C
125N12_T7 rev	GTT CCT TAC TCT CTT CCG	54 °C
Sbeetle2_for	AAA TCT TCA GGA TGT GC	56 °C
Sbeetle2_rev	ACC AAA GTT CAA AAG TGG CG	56 °C
S125N12_Beetle2 for	AGA GAC CAC ATT AGG TGC	54 °C
S125N12_Beetle2 rev	CAA AGG GGG AAA AGA TGC	54 °C
S125N12_Beetle2-2 for	GAC CTC CAA TAA ACC TAG C	56 °C
S125N12_Beetle2-2 rev	AAG GAG AGA GCA AAC AAG C	56 °C
S125N12_Beetle2-3 for	TAG GAT AGA GAT TTT CGG C	54 °C
S125N12_Eco5 for	TTT GTT AGG CAA AGG TGC G	56 °C
S125N12_Eco5 rev	GGT CTC ACT ATT TAA GGC C	56 °C

2.1.4 DNA-Sonden

Für die Hybridisierungsexperimente (2.2.9) wurden die in Tabelle 2.7 und 2.8 aufgeführten DNA-Sonden durch PCR aus genomischer DNA oder aus BACs des PRO1-Minichromosoms erstellt.

Tab. 2.7: Herkunft, Länge und Hybridisierungsort Repeat-spezifischer DNA-Sonden

DNA-Sonden	Herkunft	Sequenzlänge	Zielsequenz	Referenz
pTS5	<i>Beta procumbens</i>	160 bp	Centromerisches Satellitenrepeat in <i>Procumbentes</i>	Schmidt & Heslop-Harrison, 1996
pTS4.1	<i>Beta procumbens</i>	312 bp	Pericentromerisches Satellitenrepeat in <i>Procumbentes</i>	Schmidt & Heslop-Harrison, 1996
p18S	<i>B. vulgaris</i>	380 bp	18S-5.8S-25S rRNA	Schmidt <i>et al.</i> , 1994

Tab. 2.8: Herkunft, Länge und Hybridisierungsort Retrotransposon-spezifischer DNA-Sonden

DNA-Sonden	Herkunft	Sequenzlänge	Zielsequenz
Beetle1-LTR	BAC des PRO1-Minichromosom	346 bp	LTR-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>
Beetle1-UTR	BAC des PRO1-Minichromosom	139 bp	untranslatierter Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>
Beetle1-gag	BAC des PRO1-Minichromosom	309 bp	gag-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>
Beetle1-Protease	BAC des PRO1-Minichromosom	338 bp	Protease-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>

DNA-Sonden	Herkunft	Sequenzlänge	Zielsequenz
Beetle1-RT	BAC des PRO1-Minichromosom	258 bp	Reverse Transkriptase-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>
Beetle1-RNaseH	BAC des PRO1-Minichromosom	316 bp	RNaseH-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>
Beetle1-Integrase	BAC des PRO1-Minichromosom	348 bp	Integrase-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle1</i>
Beetle2-LTR	BAC des PRO1-Minichromosom	336 bp	LTR-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
Beetle2-UTR	BAC des PRO1-Minichromosom	522 bp	untranslatierter Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
Beetle2-gag	BAC des PRO1-Minichromosom	317 bp	<i>gag</i> -Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
Beetle2-Protease	BAC des PRO1-Minichromosom	368 bp	Protease-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
Beetle2-RT	BAC des PRO1-Minichromosom	293 bp	Reverse Transkriptase-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
Beetle2-RNaseH	BAC des PRO1-Minichromosom	323 bp	RNaseH-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
Beetle2-Integrase	BAC des PRO1-Minichromosom	329 bp	Integrase-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon <i>Beetle2</i>
97B8-SP6	BAC des PRO1-Minichromosom	420 bp	Protease-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon aus BAC 97B8
125N12-T7	BAC des PRO1-Minichromosom	469 bp	Protease-Bereich aus Ty3-gypsy-Retrotransposon aus BAC 125N12

2.1.5 Pflanzenmaterial

Das in dieser Arbeit verwendete Blattmaterial entstammt Pflanzen, die in den Gewächshäusern des Institutes für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bzw. des Lehrstuhls für Zell- und Molekularbiologie der Pflanzen der Technischen Universität Dresden angezogen wurden. In Tabelle 2.9 sind die für vergleichende Untersuchungen verwendeten Pflanzen aufgeführt. Das Saatgut ist unter den aufgeführten Registrierungsnummern in der internen Saatgutbank hinterlegt.

Tab. 2.9: Taxonomie und Chromosomenzahl (2n) der verwendeten Pflanzenarten aus der Gattung *Beta* und *Spinacia*

Gattung	Sektion	Art/Unterart	2n	Registrierungsnummer
<i>Beta</i>	<i>Beta</i>	<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	18	93161
		<i>B. vulgaris</i> subsp. <i>maritima</i>	18	54228
	<i>Corollinae</i>	<i>B. corolliflora</i>	36	18253
		<i>B. lomatosgona</i>	18	17830
	<i>Nanae</i>	<i>B. nana</i>	18	81FD26
	<i>Procumbentes</i>	<i>B. procumbens</i>	18	950056
		<i>B. webbiana</i>	18	940071
		<i>B. patellaris</i>	36	54753
<i>Spinacia</i>		<i>Spinacia oleracea</i>	12	

2.1.6 BAC- Bank

Die Erstellung einer genomischen Bank in Vektoren mit großer Klonierungskapazität war eine entscheidende Voraussetzung für den molekularen Zugang zur Centromer-DNA. Partiiell restringierte *Hind*III-Fragmente der Fragmentadditionslinie PRO1 (930143) wurden in den Vektor pBeloBAC11 (Woo *et al.*, 1994) ligiert und in DH10B™ elektrokompente Zellen transformiert. Die resultierende BAC-Bank besteht aus 50 304 BACs. Mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 125 kb und einer haploiden Genomgröße von 758 Mbp (*B. vulgaris*) entspricht das einer 8,3 fachen Genomabdeckung (Gindullis *et al.*, 2001a).

2.1.7 Computerprogramme

Zur Auswertung und Darstellung der Sequenzdaten wurden die Programme DNASTAR (Lasergene 6.0, BioTech AG), CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw; Thompson *et al.*, 1994) und TREEVIEW (Page, 1996) verwendet.

Datenbankrecherchen erfolgten in BLASTN und BLASTX (www.ncbi.nlm.gov; Altschul *et al.*, 1990, 1997) sowie in FASTA (www.ebi.ac.uk; Pearson & Lipman, 1988; Pearson, 1990). Mikroskopische Aufnahmen und Autoradiogramme wurden in Adobe Photoshop 3.0 bearbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von biologischem Material

2.2.1.1 Pflanzenanzucht

Saatgut der Zuckerrübe *Beta vulgaris* und deren Unterarten wurde direkt in Einheitserde ausgelegt. Saatgut der untersuchten Wildrüben der Sektionen *Nanae*, *Corollinae*, *Procumbentes* benötigten aufgrund des stark verkieselten Perikarps eine Vorbehandlung. Die Samen wurden für 15-60 min in konzentrierter Schwefelsäure belassen und anschließend unter fließendem Wasser gründlich gewaschen. Das Perikarp wurde durch Anritzen mit dem Skalpell aufgebrochen. Der Samen wurde in mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen ausgelegt und nach 5 bis 10-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 24-25 °C kam es zur Keimung. Die Keimlinge wurden in Einheitserde gepflanzt und im Gewächshaus weiter kultiviert.

2.2.1.2 Bakterienanzucht

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium. Rekombinante *E. coli*-Zellen wurden unter Verwendung von Antibiotika selektiert. Die Vermehrung von BAC-Klonen erfolgte in 2YT-Medium unter Zusatz von Chloramphenicol.

2.2.2 Isolation von DNA

2.2.2.1 Isolation pflanzlicher genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA erfolgte durch CTAB-Extraktion (modifiziert nach Saghai-Marooft *et al.*, 1984).

Arbeitsschritte

- 5 g schockgefrorenes Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zerkleinern, mit 25 ml 1x CTAB-Puffer (65 °C) vermischen, 1 h bei 65 °C im Wasserbad inkubieren
- Ansatz 20 min auf RT abkühlen
- 12 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zum Ansatz geben, kurz vortexen und 10 min im Überkopfschüttler (REAX2, Heidolph) drehen
- Zellfragmente und Proteine durch Zentrifugation für 30 min bei 8 500 UpM und RT (Beckman J2-HC; JA12-Rotor) in Interphase konzentrieren
- Obere Phase in neues Zentrifugenröhrchen überführen und mit 10 µl RNase A (10 mg/ml) versetzen, 30 min bei 37 °C inkubieren
- Lösung mit 0,7 Volumenanteilen (Vol.) eiskaltem Isopropanol mischen; DNA-Knäuel vorsichtig mit Pipette ansaugen, in 2 ml-Reaktionsgefäß mit 2 ml Waschlösung I überführen und 10 min auf Schüttler (Titramax, Heidolph) spülen
- Knäuel in 1 ml Waschlösung II waschen; DNA bei RT trocknen und in geeignetem Volumen 1x TE (0,5 ml-2 ml) aufnehmen, über Nacht rücklösen

<u>CTAB (1x)</u>		<u>Waschlösung I</u>	
Tris/HCl pH 8,0	100 mM	Na-Acetat	200 mM
EDTA pH 8,0	10 mM	Ethanol	76 % (v/v)
NaCl	0,7 M	<u>Waschlösung II</u>	
CTAB	1 % (w/v)	Ammoniumacetat	10 mM
β-Mercaptoethanol*	0,2 % (v/v)	Ethanol	76 % (v/v)
* Zugabe direkt vor Gebrauch			
<u>TE-Puffer (1x)</u>			
EDTA	1 M		
Tris/HCl pH 8,0	10 mM		

2.2.2.2 Isolation bakterieller Plasmid-DNA

2.2.2.2.1 BAC-Mini-Präparation

Die kostengünstige und schnelle Plasmid-Präparation erfolgte zur Bestimmung der Insertionsgröße rekombinanter BACs.

Arbeitsschritte

- Bakterienkultur in 3 ml 2YT-Medium (12,5 µg/ml Chloramphenicol) mit einer frisch ausgestrichenen Einzelkolonie beimpfen, Inkubation über Nacht bei 37 °C im Schüttler
- Zellsuspension 3 min bei 10 000 UpM (Eppendorf 5417R) im Reaktionsgefäß sedimentieren, Überstand abgießen, Pellet in 150 µl Lösung I resuspendieren
- Nach Zugabe von 200 µl Lösung II den Ansatz 8x invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- erneutes Invertieren nach Zugabe von 150 µl Lösung III
- Ansatz 15 min auf Eis inkubieren und 15 min bei 14 000 UpM und 4 °C zentrifugieren
- 400 µl PCI zum Ansatz geben, nach kräftigem Ausschütteln für 5 min zentrifugieren
- 400 µl des Überstands zu 800 µl eiskaltem Ethanol (100 %) in ein neues Reaktionsgefäß überführen, gut durchmischen und für 15 min bei 14 000 UpM und 4 °C zentrifugieren
- pelletierte DNA mit 500 µl 70 %-igem Ethanol waschen
- Pellet bei RT für 30 min trocknen und in 20 µl H₂O für 20 min bei 55 °C im Wasserbad rüklösen. 5 µl der BAC-Präparation zur Kontrolle auf ein 0,6 %-iges Agarosegel mit Ethidiumbromid auftragen und elektrophoretisch auftrennen

<u>Lösung I</u>		<u>Lösung II</u>	
Glucose	50 mM	NaOH	0,2 M
Tris/HCl ; pH 8,0	25 Mm	SDS	0,1 %
EDTA; pH 8,0	10 mM	→ frisch ansetzen	
→ vor Gebrauch Lysozym hinzufügen			
<u>Lösung III</u>		<u>PCI</u>	
Kaliumacetat pH 4,8	3 M	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1)	

2.2.2.2.2 BAC-Midi-Präparation

Für BAC-Analysen wie Restriktionsanalyse, Endsequenzierung oder direkte Sequenzierung ist eine hohe Qualität sowie Quantität der BAC-DNA notwendig. Eine BAC-Midi-Präparation erfolgte nach Protokoll mit dem „NucleoBond BAC 100“-Kit. Reste chromosomaler Bakterien-DNA wurden selektiv durch den Einsatz einer Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase laut Herstellerprotokoll entfernt. Durch Phenol-Chloroform-Extraktion wurde das Enzym aus dem Ansatz entfernt und die BAC-DNA gefällt.

Arbeitsschritte

- Reaktionsansatz mit 1 Vol. Phenol-Chloroform 1:1 ausschütteln
- 5 min bei 8 000 UpM (Eppendorf 5417R) zentrifugieren, Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen, mit 1 Vol. Chloroform vermischen und erneut zentrifugieren
- RNA aus der oberen Phase mit 0,7 Vol. eiskaltem Isopropanol (100 %) fällen, 10 min bei RT inkubieren
- 30 min bei 4 °C und 14 000 UpM zentrifugieren, DNA-Pellet in Ethanol (70 %) spülen, bei RT trocknen und in geeignetem Volumen H₂O/DEPC resuspendieren

2.2.2.2.3 Plasmid-Mini-Präparation nach Holmes & Quigley (1981)

Diese kostengünstige Schnellanalyse dient der Isolation von *high copy*-Plasmiden und wurde zur Kontrolle rekombinanter Bakterienklone auf richtige Insertion herangezogen.

Arbeitsschritte

- 1,5 ml Bakterienlösung bei 8 000 UpM (Biofuge pico, Heraeus) für 1 min pelletieren
- Überstand dekantieren und Bakterien-Pellet in 200 µl ST-Medium resuspendieren
- 20 µl Lysozym (10 mg/ml) dazugeben, Probe durchmischen und 2 min bei RT inkubieren
- Ansatz für 40 s im Heizblock (100 °C) denaturieren, 15 min auf Eis inkubieren
- Ansatz für 15 min bei 14 000 UpM und 4 °C zentrifugieren
- sichtbares Proteinpellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernen
- Plasmid-DNA aus Überstand mit 80 µl eiskaltem Isopropanol (100 %) durch Inkubation auf Eis für 30 min fällen.
- Zentrifugation für 15 min bei 14 000 UpM und 4 °C, DNA-Sediment 2 x mit Ethanol (70 %) waschen und 20 min bei RT trocknen
- Pellet in 50-100 µl 1x TE-Puffer resuspendieren; DNA bei 4 °C lagern

Saccharose-Triton (ST)-Medium

Saccharose	8 %
Triton X 100	5 %
EDTA, pH 8,0	50 mM
Tris, pH 8,0	50 mM

2.2.2.2.4 Plasmid-Mini-Präparation über eine Silikaschicht

Hochreine Plasmid-DNA ist für die Sequenzierung essentiell. Die Isolation erfolgte mit dem „GFX *Micro* Plasmid Prep“- Kit nach Angaben des Herstellers über eine Silikaschicht.

2.2.3 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese wurde bei 1-5 V/cm in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die Konzentration des Agarosegels variierte in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente von 0,6-1,2 %. Das Agarosegel enthielt 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden vor dem Beladen mit Beladungspuffer (1x Endkonzentration) vermischt.

<u>TAE-Puffer (50x)</u>		<u>Beladungspuffer (10x)</u>	
Tris	242 g	Glycerin	40 %
EDTA, pH 8,0	50 mM	Bromphenolblau (w/v)	0,1 %
Essigsäure	57,1 ml	Xylencyanol (w/v)	0,1 %
ad H ₂ O	1000 ml	Tris-acetat, pH 8,0	40 mM

2.2.3.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Insertionsgrößen von BAC-Molekülen diente die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) mit dem CHEF DR-III-System (BioRad). Die BAC-DNA (2.2.2.2.1) wurde in einem 1,2 %-igen Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und 30 min in VE-Wasser entfärbt.

<u>TBE-Puffer (10x)</u>		<u>Laufbedingungen</u>	
Tris	0,9 M	Puls	5-15 s
Borsäure	0,9 M	Spannung	6 V/cm
EDTA, pH 8,0	20 mM	Temperatur	14 °C
		Winkel α	120 °
		Laufzeit	6 h

2.2.4 Klonierung von DNA

2.2.4.1 Restriktion von genomischer und Plasmid-DNA

Die Restriktionsansätze mit Restriktionsendonukleasen des Typs II wurden entsprechend den Herstellerangaben aus 5 U Enzym/µg DNA, 10x Reaktionspuffer, DNA und Wasser zusammen pipettiert und beim Temperaturoptimum des einzelnen Enzyms für 1,5-8 h im Wasserbad inkubiert.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Um eine Religation von linearisierten Vektor-Molekülen zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

Das Enzym wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.2) entfernt und die DNA durch Gelelektrophorese (2.2.5.1) aufgetrennt. Die Vektor-Bande wurde aus dem ausgeschnitten und anschließend aus dem Agarosegel eluiert (2.2.4.3).

Desphosphorylierungs-Ansatz

Vektor-DNA	1 µg
10x Phosphatase-Puffer	5 µl
Shrimp Alkalische Phosphatase	2 U
ad H ₂ O	50 µl

2.2.4.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zu klonierende DNA-Stücke wurden nach Restriktion (2.2.3.1) oder PCR-Amplifikation (2.2.4) elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.5.1). Die resultierenden DNA-Banden wurden im präparativen Modus unter dem Transilluminator (GelDoc 2000; Biorad) mit dem Skalpell ausgeschnitten und für Klonierungs- oder Markierungsreaktionen aus der Gelmatrix isoliert.

2.2.4.3.1 Extraktion aus Agarosegelen

Mit dem Nukleo Spin Extract Kit wurden erzeugte DNA-Fragmente laut Herstellerprotokoll aus dem Agarosegel extrahiert, mit 20-50 µl H₂O aus der Säule eluiert und weiterverwendet.

2.2.4.3.2 Elektroelution

Große DNA-Fragmente (>10 kb) wurden in einem 1 %-igen Agarosegel ohne Ethidiumbromid elektrophoretisch (2.2.3) aufgetrennt. Um das Fragment im Gel zu lokalisieren, wurde neben der präparativen Probestasche zusätzlich eine Kontrolltasche mit einem Aliquot der Probe beladen, die später abgetrennt und in Ethidiumbromid-Lösung angefärbt wurde.

Arbeitsschritte

- nach dem Auftrennen (2 V/cm) der DNA-Fragmente die Kontrolltasche und den Längenstandard mit dem Skalpell aus dem Gel abtrennen, Gelstück im Ethidiumbromid-Lösung für 10 min anfärben und in VE-Wasser entfärben
- unter dem Transilluminator mit einem fluoreszierenden Lineal die Laufstrecke des Fragments ausmessen
- mit dem Skalpell korrespondierenden Gelbereich aus dem ungefärbtem Gel schneiden, Gelstück bis zur weiteren Behandlung bei 4 °C lagern
- Dialyseschlauch 2x 30 min in H₂O bei 4 °C unter Schütteln waschen; 1 h in 1x TAE-Puffer bei 4 °C äquilibrieren

- Gelstück mit aufgetrennter DNA in den am unteren Ende mit einer ethanolgespülten Klammer abgeklemmten Dialyseschlauch stecken, 200 µl 1x TAE-Puffer hinzupipettieren
- Dialyseschlauch oben mit zweiter Klemme luftblasenfrei verschließen
- Elektrophorese erfolgt für 2 h bei 5 V/cm in 1x TAE-Puffer bei 4 °C
- freigesetzte DNA durch Umpolen der Gelkammer für 1 min bei gleicher Stromstärke vom Dialyseschlauch lösen
- Puffer mit DNA vorsichtig aus Dialyseschlauch pipettieren und mit Ethanol fällen

2.2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Aus PCR (2.2.4) oder DNA-Restriktionen (2.2.3.1) resultierende DNA-Fragmente wurden gereinigt (2.2.3.3) und in geeignete Vektoren ligiert. PCR-Produkte wurden in den pGEM[®]-T-Vektor laut Herstellerangaben kloniert. Restrungierte DNA-Fragmente wurden in den mit dem jeweiligen Restriktionsenzym präparierten pUC18-Vektor (2.2.4.1; 2.2.4.2) integriert. Dazu wurden 50 ng Vektor-DNA, 50-200 ng DNA-Fragment, 1 Unit T4-DNA-Ligase, 1x Reaktionspuffer und 1mM ATP in einem 20 µl Reaktionsvolumen angesetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.4.5 Shot gun-Klonierung

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann das Genom eines Organismus bzw. große DNA-Fragmente in gut handhabbare Fragmente zerlegt werden. Die *Shot gun*-Klonierung von BACs erzeugte Fragmente in praktikabler Größe und diente der Erstellung von Subklon-Banken.

Arbeitsschritte

- 300 ng BAC-DNA mit 10 U Restriktionsenzym und 1x Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 2 h im Wasserbad im Temperaturoptimum inkubieren
- zeitgleich 20 µl Restriktionansatz mit 100 ng pUC18-Vektor und 10 U Restriktionsenzym präparieren
- Hitzeinaktivierung der Endonuklease bei 70 °C für 20 min
- 90 ng restringierte BAC-DNA und 25 ng restringierten pUC18-Vektor mit 1 U T4 DNA-Ligase und 1x Enzympuffer in einem 20 µl Ligationsansatz ansetzen und bei 16 °C über Nacht inkubieren

2.2.4.6 Transformation von Plasmid-DNA in Wirtsbakterien

2.2.4.6.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Das Bakterium *E. coli* als Wirtsorganismus ist in der Lage, im kompetenten Zustand DNA-Plasmide aufzunehmen und zu propagieren.

Arbeitsschritte

- frische Einzelkolonie in 3 ml LB-Flüssigmedium animpfen und über Nacht bei 37 °C im Schüttler (Certomat, Sartorius) inkubieren
- Übernachtskultur in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 Liter vorgewärmtes LB-Medium überimpfen und bis zu einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,6-0,8$ bei 37 °C im Inkubator bei 220 UpM schütteln
- Bakterienkultur auf zwei Zentrifugengefäße aufteilen und für 10 min bei 5 000 UpM und 4°C zentrifugieren (Beckman J2-21M/E)
- während der folgenden Schritte die Ansätze auf Eis gekühlt halten
- Überstand dekantieren und Bakterienpellets vorsichtig in 10 ml kaltem Glycerin (10 %) resuspendieren, auf 200 ml mit 10 % kaltem Glycerin auffüllen und für 10 min bei 5 000 UpM und 4 °C zentrifugieren
- Waschschrift wiederholen, Pellets in 10 ml kaltem Glycerin (10 %) aufnehmen, in zwei 50 ml Röhrchen überführen und mit 10 % Glycerin auf je 50 ml einstellen
- 10 min bei 5 000 UpM und 4 °C zentrifugieren und sedimentierte Bakterien in 2 ml kaltem 10 % Glycerin resuspendieren
- 50 µl Aliquots in sterile Reaktionsgefäße pipettieren und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C lagern

2.2.4.6.2 Elektroporation

Rekombinante Plasmide wurden mittels Elektroporation in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. 50 µl kompetente Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut, mit einem Mikroliter Ligationsansatz vermischt und in eine vorgekühlte 0,1 cm-Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporator (Easyject Prima; Equibio) wurden die Bakterien einer Spannung von 1,5-2,5 kV ausgesetzt, sofort in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für 1- 1,5 h bei 37 °C unter Schütteln (220 UpM) inkubiert. Unterschiedliche Volumina (50-500 µl) des Ansatzes wurden auf Indikatorplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden für die Amplifikation genomischer Sequenzen und klonierter DNA-Fragmente aus Vektoren verwendet, weiterhin fanden sie Verwendung für die Markierung von Sonden (2.2.9.3) in Hybridisierungsexperimenten. Je nach Fragestellung fanden neben der thermostabilen *Taq*-Polymerase DNA-Polymerasen mit Korrekturaktivität, besonders bei der Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen, Anwendung. Die PCR-Reaktion erfolgte in den Thermocyclern „PTC 200“ (MJ Research) und „Primus“ (MWG).

2.2.5.1 Amplifikation genomischer Sequenzen

Die Amplifikation von Ty3-*gypsy*-Retrotransposon-spezifischen Sequenzen erfolgte aus genomischer DNA verschiedener Sektionen der Gattung *Beta* und aus BAC-DNA.

Reaktionsansatz		Reaktionszyklen		35 Zyklen
DNA- Template	50-150 ng	94 °C	5 min	
10x PCR-Puffer (15mM MgCl ₂)	5 µl	94 °C	30 s	
dNTP- Mix(je 2mM)	5 µl	x °C	30 s	
Primer- forward (50 pmol/µl)	1 µl	72 °C	y s	
Primer- reverse (50 pmol/µl)	1 µl	72 °C	5 min	
<i>Taq</i> - Polymerase	1-2 U	4 °C	∞	
ad H ₂ O	50 µl			

Für die Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen wurde das „Expand High Fidelity PCR System“ verwendet. Ein Polymerasegemisch aus *Taq*-Polymerase und einer Polymerase mit *proofreading*-Aktivität garantiert dabei eine fehlerfreie Amplifikation. Eine effiziente Amplifikation langer PCR-Fragmente (< 5 kb) erfolgte mit dem „Expand Long Template PCR System“. Die Reaktionsansätze und Reaktionszyklen erfolgten gemäß den Vorgaben des Herstellers.

2.2.5.2 Amplifikation klonierter Sequenzen

Rekombinante Plasmide wurden durch PCR auf Anwesenheit und Größe der klonierten DNA untersucht. Weiterhin erfolgten aus isolierter Plasmid-DNA (2.2.2.2) Amplifikationen für die Sondenerstellung, Sondenmarkierung und DNA-Sequenzierung.

2.2.5.3 Inverse PCR

Für die Analyse unbekannter flankierender Sequenzabschnitte diente die inverse PCR (iPCR). Dafür wurde genomische DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt, die im bekannten Sequenzbereich als auch in der flankierenden Region schneiden. Die so entstandenen Restriktionsfragmente wurden mit einer Ligase zu einer Ringstruktur geschlossen. Diese Struktur wurde unter Verwendung von Oligonukleotidprimern aus den bekannten

Randbereichen amplifiziert und anschließend kloniert. Die inverse PCR wurde bei der Ermittlung von LTR-flankierenden Regionen von Ty3-*gypsy*-Retrotransposons eingesetzt. Dazu wurde ein Mikrogramm genomische DNA restringiert. Nach anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung (2.2.3.1) wurde ein Größenbereich von 500 bp bis 2 kb aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (2.2.4.3). In einem 100 µl Ligationsansatz wurden 20-50 ng der DNA-Fragmente zu einer Ringstruktur bei 16 °C über Nacht ligiert (2.2.4.4). Unbekannte Fragmentbereiche wurden in der PCR unter Einsatz von 10 % des Ligationsansatzes amplifiziert. Analysen an BAC-DNA erfolgten durch Religation von 50 ng restringierter DNA und einer Sequenzamplifikation aus 2 ng Template.

2.2.6 Southern-Hybridisierung

2.2.6.1 Southern-Transfer aus Agarosegelen

Restringierte (2.2.3.1) und elektrophoretisch aufgetrennte DNA (2.2.5.1) wurde unter denaturierenden Bedingungen durch die Kapillarkräfte eines Pufferstroms von der Gelmatrix auf eine positiv geladene Nylonmembran überführt (Southern, 1975). Der alkalische Transfer erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) über Nacht in Transfer-Lösung. Die Membran wurde anschließend in 2x SSC gespült und die DNA für 2 h bei 80 °C auf der Membran fixiert.

<u>Transfer-Lösung</u>		
NaOH	0,5 M	
NaCl	1,5 M	pH 7,0

2.2.6.2 Nukleinsäuretransfer aus Bakterienkulturen (Kolonie-Filter)

Die Bakterienkolonien wurden entweder in einem Raster auf eine Masterplatte überimpft und nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht auf eine Nylonmembran abgezogen oder geordnet in 96er-Mikrotiterplatten in 150 µl LB-Freezing-Medium angelegt, um sie auf eine Membran zu überstempeln. Dafür wurden die Bakterien mit einem Replikator direkt auf eine Nylonmembran entsprechender Größe, die auf einer Agarplatte auflag, überführt. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Plasmid-DNA durch nachfolgende Behandlung in den aufgeführten Lösungen freigesetzt und fixiert.

Arbeitsschritte

- Kolonie-Filter mit Bakterienzellen nach oben auf getränktes Whatman-Papier für 5 min in Lösung I, 10 min in Lösung II und 10 min in Lösung III behandeln
- Membran bei RT abtrocknen lassen und freigesetzte DNA für 20 min bei 80 °C fixieren
- Koloniefilter vor der Hybridisierung für 5 min in 2x SSC spülen

<u>Lösung I</u>	<u>Lösung II</u>	<u>Lösung III</u>
NaOH 0,5 M	Tris/HCl pH 7,5 1 M	Tris, pH 6,5 1 M
	NaCl 3 M	

2.2.6.3 Nukleinsäuretransfer von isolierter Plasmid-DNA (Dot Blot)

Der Einsatz von Dot Blot-Filtern ermöglichte eine gleichzeitige Analyse von 96 auf einer Membran positionierten Plasmid-Proben.

Arbeitsschritte

- Plasmid-DNA (2.2.6.2) mit einer Endkonzentration von 50 ng/Probe in einem Gesamtvolumen von 100 µl unter Zusatz von 10 µl Beladungspuffer mischen
- Filterpapier (GB 003) in Format der Dot Blot-Apparatur (Minifold, Schleicher & Schüll) zurechtschneiden, mit 2x SSC anfeuchten und auf die Filterträgerplatte legen
- Nylonmembran zurechtschneiden, mit 2x SSC anfeuchten und auf das Filterpapier legen
- nach dem Spülen der Probenreihen mit 200 µl 2x SSC werden die Proben auftragen, DNA analog wie auf Kolonie-Filter (2.2.6.2) fixieren

2.2.6.4 Hybridisierung von DNA-Sequenzen

Für die Markierung von DNA-Sonden fand die *Random Priming*-Methode nach Feinberg & Vogelstein (1983) Anwendung, wobei die radioaktiv markierten Nukleotide α -[³²P]-dATP und α -[³²P]-dCTP inkorporiert wurden. Nichteingegebene radioaktive Nukleotide werden durch Ausschlusschromatographie über eine Säule von den markierten Fragmenten abgetrennt.

Arbeitsschritte

- 40-80 ng DNA auf 70 µl mit H₂O auffüllen, 5 min denaturieren und auf Eis stellen
- Zugabe von Primer, Nukleotiden, Puffer und Enzym; 1 h bei 37 °C inkubieren
- Ansatz auf eine Sephadex G50-Säule pipettieren und für 2 min bei 2 000 UpM (Eppendorf 5810R) und RT zentrifugieren
- Säule mit 100 µl TE-Puffer spülen, erneute Zentrifugation bei 2 000 UpM
- Probe 10 min denaturieren und in die Hybridisierungslösung geben

<u>Markierungsansatz</u>	
Template-DNA	40-80 ng
dGTP, dTTP-Mix (0,5 mM)	5 µl
Oligo-(dNTP) ₆ (0,2 µg/µl)	10 µl
Klenow-Puffer (10x)	10 µl
Klenow-Fragment	2 U
α -[³² P]-dATP (3000 Ci/mmol)	1-3 µl
α -[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	1-3 µl
ad H ₂ O	100 µl

2.2.6.4.1 Hybridisierung

Die Membran wurde 3 h in Hybridisierungslösung bei 60 °C unter Schütteln im Wasserbad vorhybridisiert. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre transferiert und mit 10 ml frischer Hybridisierungslösung bedeckt. Nach Zugabe der denaturierten DNA-Sonde wurde die Membran bei 60 °C im Rotationsofen (GFL) über Nacht inkubiert.

<u>Denhardt-Lösung (100x)</u>			<u>SSPE (20x)</u>		
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	2	%	NaCl	3	M
BSA (Fraktion V)	2	%	NaH ₂ PO ₄	0,2	M
Ficoll 400	2	%	EDTA	20	mM
Lagerung in Aliquots bei -20 °C			pH 7,4		
<u>Hybridisierungsmedium</u>			<u>20x SSC</u>		
100x Denhardt-Lösung	5	x	NaCl	3	M
20x SSPE	5	x	NaCitrat	0,3	M
SDS	0,2	%	pH 7,0		
Lagerung in Aliquots bei -20 °C; vor Gebrauch mit denaturierter Heringssperma-DNA [2µg/µl]) versetzen					

2.2.6.4.2 Waschen der Membran und Audioradiographie

Nichtgebundene Sonden-DNA wurde bei 60 °C abgewaschen, indem die Membran jeweils für 10 min in 2x SSC/0,1 % SDS bzw. in 1x SSC/0,1 % SDS gespült wurde. Für stringente Bedingungen wurde die SSC-Konzentration auf 0,5x SSC herabgesetzt. Die Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm für wenige Stunden bis mehrere Tage bei -70 °C exponiert.

2.2.6.4.3 Entfernen der DNA-Sonde von der Membran

Die Filter wurden 15 min in 0,2 M NaOH/0,1 % SDS bei RT auf dem Schüttler und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach Schütteln für 20 min in Neutralisierungslösung und 5 min in 2x SSC wurde die Membran bei 80 °C für 20-30 min getrocknet.

<u>Neutralisierungslösung</u>	
NaCl	3 M
Tris pH 7,0	0,5 M

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Nukleotidabfolge fand die Sequenzierungsmethode nach Sanger *et al.*, 1977) verwendet. Eine Vier-Farben-Detektion in einem Reaktionsansatz erfolgte im CEQ 8000 (Beckman Coulter) mit dem CEQ™DTCS Quick Starter Kit nach Angaben des Herstellers.

Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm „DNA-STAR“ (GATC BioTech AG). Homologie und Divergenz zwischen Sequenzen auf Nukleotid- und Proteinebene wurden mit dem Programm „CLUSTALW“ berechnet und konnten mit dem Programm „Tree View“ als Dendrogramm dargestellt werden. Die ermittelte Nukleotid- und Aminosäuresequenz wurde mit den Suchalgorithmen FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>) und BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mit Sequenzen aus der EMBL-Datenbank verglichen.

2.2.8 Arbeiten mit RNA

2.2.8.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die RNA wurde mit dem TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen) aus mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossenen Blättern verschiedener *Beta*-Spezies, basierend auf der „single Step“ RNA-Isolation von Chomczynski & Sacchi (1987), extrahiert.

Arbeitsschritte

- gemörsertes Blattmaterial in 1 ml TRIzol pro eingesetzten Gramm Gewebe homogenisieren, Ansatz 5 min bei RT inkubieren
- 0,2 ml Chloroform/ml TRIzol dazugeben und durch kräftiges Schütteln für 15 s mischen, Ansatz 2-3 min bei RT inkubieren
- 15 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Obere wässrige Phase in steriles RNase-freies Reaktionsgefäß überführen und mit 0,5 ml Isopropanol/ml TRIzol gut durchmischen, 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugieren
- RNA-Pellet mit 1 Vol. Ethanol (75 %; H₂O/DEPC) waschen, 5 min bei 7 500 x g und 4 °C zentrifugieren
- RNA bei RT trocknen, geeignetes Volumen RNase-freies Wasser dazugeben, 10 min bei 55-60 °C inkubieren; gelöste RNA bei -70 °C lagern

2.2.8.2. DNase-Behandlung der RNA

Zur Entfernung von DNA-Resten wurden je 5 µg isolierter RNA eine Unit DNaseI (MBI Fermentas) mit 10x Reaktionspuffer in entsprechenden Reaktionsvolumen eingesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.2.2.2) gereinigt.

2.2.8.3 cDNA-Synthese

Die Reverse Transkription ist eine hochempfindliche Methode, um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen. Sie erfolgte mit dem „iScript[™] cDNA Synthesis Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers aus Gesamt-RNA (2.2.8.1) verschiedener *Beta*-Arten.

2.2.8.4 RNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurden die Proben mit formamidhaltigem Beladungspuffer (MBI Fermentas) versetzt, für 5 min bei 70 °C denaturiert und im 1,3 %-igen MOPS-Gel bei 1V/cm aufgetrennt.

<u>MOPS (10x)</u>		<u>H₂O/DEPC</u>	
MOPS	200 mM	DEPC	1 ml
Na-Acetat	50 mM	ad H ₂ O	1000 ml
EDTA	10 mM	12 h bei RT inkubieren und autoklavieren	
DEPC	0,1 %		
12 h bei RT inkubieren und autoklavieren			
<u>MOPS-Gel (100 ml)</u>		<u>Laufpuffer</u>	
H ₂ O/DEPC	80 ml	10x MOPS	100 ml
Agarose	1,3 g	Formaldehyd (37 %)	20 ml
Aufkochen und auf 60 °C abkühlen		H ₂ O/DEPC ad	1000 ml
10x MOPS	10 ml		
Formaldehyd (37 %)	10 ml		

2.2.8.5 Northern-Hybridisierung

2.2.8.5.1 Northern-Transfer aus denaturierenden Agarosegelen

RNA wurde im 1,3 %-igen MOPS-Gel (2.2.8.4) bei 2,5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde das Gel 10 min in H₂O/DEPC gespült, 15 min in 0,05 M NaOH denaturiert und 10 min in 10x SSC äquilibriert. Die Transfer erfolgte über Nacht in 20x SSC-Puffer (Alwine *et al.*, 1977).

Die Membran wurde 20 min bei 80 °C im Trockenschrank fixiert. Alle Lösungen wurden mit 0,1 % DEPC über Nacht behandelt und anschließend autoklaviert.

2.2.8.5.2 Hybridisierung

Die Hybridisierungsreaktion des Northern-Filters erfolgte mit einzelsträngiger radioaktiv markierter Sonden-DNA analog zu den Bedingungen der Southern-Hybridisierung (2.2.6.4.1), jedoch bei einer Inkubationstemperatur von 55 °C.

2.2.8.5.3 Waschen der Membran und Detektion

Das Abwaschen nicht gebundener Sonde vom Northern-Filter erfolgte analog den Schritten bei der Southern-Hybridisierung (2.2.6.4.2) bei um 5 °C erniedrigter Inkubationstemperatur. Die Autoradiographie erfolgte für zwei bis 14 Tage.

2.2.9 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularcytogenetische Methode mit deren Hilfe Nukleinsäuresequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen lokalisiert werden können. Fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden sind direkt im Mikroskop detektierbar, während mit Haptenen (Biotin, Digoxigenin) markierte DNA-Sonden erst durch die Bindung spezifischer fluorochrom-markierter Antikörper im Mikroskop sichtbar werden. Durch den Einsatz von unterschiedlich markierten DNA-Sonden ist ein simultaner Nachweis mehrerer Sequenzen möglich.

2.2.9.1 Fixierung des Pflanzenmaterials

Durch 8-Hydroxychinolin wurden die Zellen des Meristems angereichert und die Zellzyklen innerhalb des Gewebes synchronisiert.

Arbeitsschritte

- 1 bis 2 cm lange Blätter junger Pflanzen 2 h bei RT in 2 mM 8-Hydroxychinolin inkubieren
- Hydroxychinolin entfernen, Blätter mit Fixierlösung für einige Stunden bei RT fixieren
- nach Wechsel der Fixierlösung sind die Blätter für mehrere Wochen bei – 20 °C lagerfähig

2.2.9.2 Präparation von Chromosomen

Die Isolation von Zellkernen und die Herstellung von Chromosomenpräparaten erforderte eine enzymatische Vorbehandlung zum Abbau des Cytoplasma. Die Tropfpräparate wurden in einer modifizierten Form nach der Methode von Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000) hergestellt.

Arbeitsschritte

- Objektträger für 2 h in Chromschwefelsäure inkubieren, 20 min unter fließendem Wasser spülen und mehrmals mit H₂O waschen, über Nacht bei 37 °C trocknen und vor Verwendung in 100%-igem EtOH spülen

2 Material und Methoden

- fixierte Blätter aus der Fixierlösung nehmen, abtropfen und für 2x 15 min in 1x Enzympuffer auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation des Gewebes in 1 ml Enzymlösung bis zur Mazeration der Zellwand bei 37 °C für 3-4 h
- Zellsuspension durch Auf- und Absaugen mit einer Transferpipette mischen und 4 min bei 4 000 UpM (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugieren
- Überstand bis auf 100 µl abnehmen, Suspension mit 1 ml 1x Enzympuffer vermischen, erneut zentrifugieren und den Überstand auf 100 µl reduzieren; diesen Arbeitsschritt drei bis viermal wiederholen
- 1 ml Fixierlösung zugeben, Gemisch abzentrifugieren, den Überstand soweit abnehmen bis der obere Teil des Pellets sich ablöst; den Schritt dreimal wiederholen, die Suspension abschließend auf 100 µl reduzieren und auf Eis stellen
- Kernsuspension mischen und 10-15 µl aus 50 cm Höhe auf einen gereinigten Objektträger auftropfen; zum Spreiten der Zellkerne den Objektträger kräftig schütteln und an der Luft trocknen lassen
- Präparate unter einem Phasenkontrastmikroskop kontrollieren, das Gebiet mit gespreiteter Probe auf dem Objektträger mit einem Diamantenstift eingrenzen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubieren; die Objektträger sind bei 4 °C trocken lagerfähig

Enzympuffer (10x)

Zitronensäure pH 4,5	40 mM
Natriumcitrat	60 mM

McIlvaine-Puffer

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	164 mM
Zitronensäure pH 7,0	8 mM

Enzymlösung I

Cellulase (<i>Aspergillus niger</i> , 0,45 U/mg; Sigma)	3,0 %
Cellulase (Onozuka-R10, 1,3 U/mg; Serva)	0,1 %
Pectolyase (<i>Aspergillus japonicus</i> , 3,9 U/mg ; Sigma)	0,3 %
Cytohelicase (<i>Helix pomatia</i> ; Sigma)	0,3 %
in sterilem 1x Enzympuffer (pH 4,5)	

Enzymlösung II

Cellulase (<i>Aspergillus niger</i> , 80 U/ml; Sigma)	17,8 %
Cellulase (Onozuka-R10, 10 U/ml; Serva)	0,77 %
Pektinase (13,5 U/ml; Sigma)	3,0 %
in sterilem 1x Enzympuffer (pH 4,5)	

Fixierlösung

3 Teile Methanol (100%) mit 1 Teil Essigsäure (100%) → immer frisch ansetzen

DAPI- Lösung

100 µg/ml in H₂O als Stammlösung (Lagerung bei -20 °C)
2 µg/ml in McIlvaine-Puffer als Arbeitslösung

2.2.9.3 Markierung der DNA-Sonden für die FISH

Für die Markierungsreaktion wurden klonierte Fragmente (Tab. 2.7, 2.8) verwendet, die entweder mit spezifischen Primern oder flankierenden M13 Universal-Primern (Tab. 2.5, 2.6) aus dem Plasmid amplifiziert wurden.

Arbeitsschritte

- PCR-Reaktion mit den üblichen Primer- und Templatekonzentrationen (2.2.4.1) in einem Volumen von 25 µl ansetzen
- zum dNTP-Mix (200 µM Endkonzentration) jeweils 70 µM Biotin-16-dUTP oder 36 µM Digoxigenin-11-dUTP zusätzlich zugeben
- Reaktion unter Standardbedingungen durchführen
- markierte DNA mit Ethanol präzipitieren (2.2.3.3.3), in 20 µl H₂O resuspendieren und bei -20 °C lagern

2.2.9.4 Vorbehandlung, Hybridisierung und Waschen

Für alle Inkubations- und Waschschrte mit großen Volumen Lösung wurden die nummerierten Objektträger in ein Coplin-Gefäß gestellt, geringere Volumina wurden direkt auf den Objektträger aufgetragen und das Präparat durch einen Kunststoffstreifen vor Austrocknung geschützt.

Vorbehandlung der Chromosomen

Arbeitsschritte

- RNase A-Stammlösung (10 mg/ml) mit 2x SSC 1:100 verdünnen, 200 µl der Lösung auf den Objektträger pipettieren, mit einem hitzestabilen Kunststoffstreifen abdecken und 1h bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubieren
- Objektträger in ein mit 2x SSC gefülltes Coplin-Gefäß überführen, die Abdeckung entfernen und 3x 5 min bei RT auf einem Schüttler waschen
- die Äquilibration des Präparates erfolgt in 0,01 N HCl für 1 min bei RT
- Pepsin-Konzentrat (0,5 mg/ml) 1:50 in 0,01 N HCl verdünnen, 200 µl der Lösung auf den Objektträger pipettieren, mit einem Kunststoffstreifen abdecken und 15 min bei 37 °C in einem Thermocycler (Hybaid „Touch down“, MWG) inkubieren
- Objektträger in ein mit 2x SSC gefülltes Coplin-Gefäß stellen, den Kunststoffstreifen entfernen und 2x 5 min waschen
- 4 %-ige (w/v) Paraformaldehydlösung in H₂O ansetzen und durch Titrierung mit konzentrierter NaOH sowie dem Erhitzen auf 70 °C eine klare Lösung herstellen

- Objektträger in auf RT abgekühlter Paraformaldehydlösung für 10 min inkubieren und durch drei gründliche Waschschrte für je mindestens 5 min in 2x SSC spülen
- zur Dehydration den Objektträger durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe (70 %, 90 %, 96 %) führen und anschließend lufttrocknen

Hybridisierung

Die verwendeten Sonden (Tab. 2.7) hybridisierten bei einer Stringenz von 76 % (Meinkoth & Wahl, 1984) an die komplementäre chromosomale Sequenz.

<u>Hybridisierungslösung</u>		
Formamid (Ultra pure)	50	%
Dextransulfat	20	%
SSC	2	x
SDS	0,15	%
Heringssperma-DNA	250	ng/μl
DNA-Sonde	1	ng/μl
ad H ₂ O	30	μl

Arbeitsschritte

- Hybridisierungslösung für 10 min auf 70 °C erhitzen, dann 5 min auf Eis kühlen, auf das Präparat pipettieren und mit einem Kunststoffstreifen luftblasenfrei abdecken
- die Denaturierung der Chromosomen, sowie die Reassoziaton der DNA erfolgt durch schrittweise Abkühlung auf 37 °C unter feuchtigkeitsgesättigten Bedingungen in einem Thermocycler (Hybaid, MWG):

8 min	70 °C
5 min	55 °C
2 min	50 °C
3 min	45 °C
10 min	37 °C

- Objektträger in vorgewärmte Feuchtkammer überführen und über Nacht bei 37 °C inkubieren

Waschen

Arbeitsschritte

- Abdeckung unter 2x SSC entfernen, den Objektträger 2x 5 min bei 42 °C in vorgewärmter Waschlösung (20 % Formamid in 0,1x SSC; Stringenz von 79 %) unter Schütteln waschen
- Objektträger 2x 5 min bei 42 °C mit vorgewärmten 2x SSC und 1x 5 min in 2x SSC bei RT schwenken

2.2.9.5 Signaldetektion durch Antikörperbehandlung

Die markierten Sondenmoleküle wurden durch biotinbindendes Streptavidin bzw. Digoxigenin-Antikörper, die mit Fluorochromen gekoppelt sind, detektiert. DAPI, ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff fluoresziert unter UV-Anregung blau, so dass Chromosomen sichtbar gemacht werden konnten.

Arbeitsschritte

- Objektträger 5 min mit 4x SSC/0,2 % Tween20 waschen, 200 µl 5 % BSA in 4x SSC/0,2 % Tween20 auftropfen und Objektträger mit einem Kunststoffstreifen bedeckt 30 min bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubieren
- nach Entfernen der überschüssigen „Blocking“-Lösung die Objektträger mit je 50 µl einer 1:100 Verdünnung von Antikörper-Lösung A oder einer 1:150 Verdünnung von Antikörper-Lösung B in 3 % BSA/4x SSC/0,2 % Tween20 versetzen, mit einem Kunststoffstreifen bedecken und 1 h bei 37 °C in der Feuchtkammer inkubieren
- den Kunststoffstreifen in 2x SSC entfernen und die Objektträger 3x 10 min in 4x SSC/0,2 % Tween20 bei 42 °C im Wasserbad schwenken.
- nach Entfernen des restlichen 4x SSC/0,2 % Tween20 mit 100 µl DAPI-Lösung (2-4 µg) betropfen, mit einem Kunststoffstreifen bedecken und 10-15 min bei RT inkubieren
- Objektträger kurz in 4x SSC/0,2 % Tween20 eintauchen, ablaufen lassen, mit 1 Tropfen Citifluor AF1/Glycerin (*Antifade*-Lösung) versetzen und mit einem Glasplättchen bedecken
- nach Ausquetschen der überschüssigen *Antifade*-Lösung die Präparate über Nacht bei 4 °C, danach trocken und kühl lagern

Detektionslösungen

Antikörper- Lösung A

200 µg/ml Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) an Anti- Digoxigenin AK (Boehringer) in 4x SSC/0,2 % Tween20

Antikörper- Lösung B

1 mg/ml Cy3 an Streptavidin (Sigma) in 4x SSC/0,2 % Tween20

2.2.9.6 Rehybridisierung von Chromosomenpräparaten

Um ein Chromosomenpräparat mehrfach für eine FISH einzusetzen, wurde nach einem Protokoll von Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000) die DNA-Sonde vom Präparat entfernt.

2.2.9.7 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich mikroskopisch sichtbar machen, indem sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt (Anregungslicht) und die ausgestrahlte Fluoreszenz (Emission) mit geeigneten optischen Filtern sichtbar macht. Je nach verwendetem Fluorochrom sind andere Filtersätze notwendig (Tab. 2.10).

Tab. 2.10: Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungs-Maximum (nm)	Emissions-Maximum (nm)	Farbe der Fluoreszenz	Filternummer (Zeiss)
FITC	495	523	grün	09
Cy3	550	570	rot	15
DAPI	358	461	blau	01

Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte am UV-Fluoreszenzmikroskop „Axioplan2 imaging“ der Firma Zeiss. Die in der Tabelle 2.11 aufgeführten Filtersätze wurden verwendet.

Tab. 2.11: Verwendete Filtersätze und ihre Eigenschaften

Filtersatz	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Strahlenteiler	geeignete Fluorochrome
01	BP 365/12	LP 397	FT 395	DAPI
09	BP 450-490	LP 515	FT 510	FITC
15	BP 546/12	LP 590	580	Cy3
25 Dreifachfilterblock	TBP 400+495+570	TBP 460+530+610	TFT 410+505+585	DAPI/FITC/Cy3

Die mikroskopischen Bilder wurden bei einer 1600-fachen Vergrößerung mit der Filmkamera „MC 80 DX“ von Zeiss auf „Fujicolor Superia 400“-Farbnegativfilmen dokumentiert. Die Belichtungszeiten waren von der Signalstärke und des zur Detektion verwendeten Filtersatzes abhängig und lagen im Bereich zwischen 1-8 Sekunden.

Die Negative wurden durch Scannen mit dem Film-Negativ-Scanner „Nikon LS-1000“ bei einer Auflösung von 400 dpi digitalisiert und die Bilddateien mit Hilfe der Software „Adobe Photoshop“ (2.1.9) prozessiert und ausgedruckt.

3. Ergebnisse

Die Grundlage für die Genomanalyse bei Rübe bildete die genomische BAC-Bank eines Zuckerrübengenoms, welche partiell mit *HindIII* restringierte Megabasen-DNA der Chromosomen der *Beta vulgaris*-Linie PRO1 enthält. Da dieser Genotyp mit einem zusätzlichen Wildrüben-Minichromosom aus *Beta procumbens* die Möglichkeit bietet centromerische DNA eines isoliert vorliegenden Chromosoms zu analysieren, stellt die PRO1 BAC-Bank eine geeignete Ressource für die molekulare Charakterisierung pflanzlicher Centromere dar.

Ausgangspunkt für die Selektion centromerischer BAC-Klone des PRO1-Minichromosoms waren Einblicke in die Organisation der Satelliten-DNA in den Centromeren von *Beta procumbens* (Gindullis *et al.*, 2001a, Abb. 3.1).

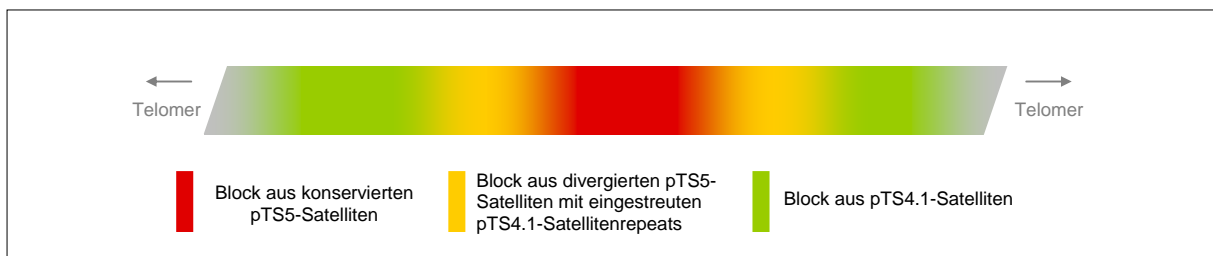


Abb. 3.1: Modell der Organisation der Satelliten-DNA an *Beta procumbens*-Centromeren

Die centromerischen Satelliten-Familien sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Der Bereich, in dem divergierte pTS5-Satellitenrepeats vorliegen und pTS4.1-Repeats eingestreut sind, ist gelb dargestellt.

Die hochrepetitiven Satelliten-Familien pTS5 und pTS4.1 aus der Centromer-Region von *B. procumbens*-Chromosomen dienten als Hybridisierungssonden für die Selektion von BACs auf *high-density*-Koloniefiltern (Abb. 3.2).

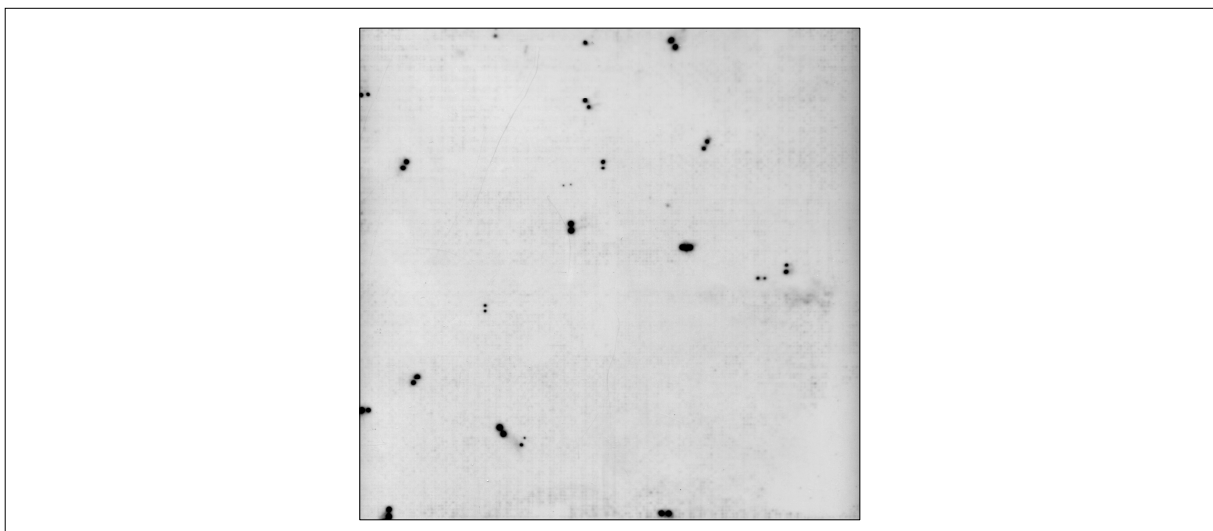


Abb. 3.2: Selektion von centromerischen BAC-Klonen durch Kolonie-Hybridisierung

Ein *high-density*-Koloniefilter mit 9216 BACs (doppelt aufgetragen) wurde mit der Sonde pTS5 hybridisiert und zeigt 18 positive BAC-Klone.

Es wurden 19 200 BAC-Klone untersucht, was etwa 40% der kompletten BAC-Bank und einer mehr als dreifachen Genomabdeckung entspricht. Dabei wurden 24 positive BAC-Klone mit starkem Hybridisierungssignal und acht positive BACs mit Signalen mittlerer Intensität identifiziert. Diese BACs wurden in vier Klassen zusammengefasst, welche auf der Existenz und Redundanz der centromerischen Satelliten pTS5 und pTS4.1 beruhen.

BACs der Klasse I enthalten ausschließlich das centromerische Satellitenrepeat pTS5 in hoher Kopienzahl und weisen zudem Ty3-gypsy-Retrotransposons in hoher Abundanz auf. Diese BACs stellen vermutlich die „Core-Region“ des Centromers dar und werden als direkte Kandidatenklone für die Region eines funktionellen Centromers angesehen. BACs der Klasse II zeichnen sich durch die Präsenz der Satelliten pTS5 und pTS4.1 in hoher Kopienzahl aus. Sie beinhalten Sequenzen aus der Region, die den Übergang in das pericentromerische Heterochromatin darstellt. BACs der Klasse III werden durch das überwiegende Vorkommen des hochabundanten pTS4.1-Satelliten bestimmt. Da das pTS5-Satellitrepeat nicht nachweisbar ist, beinhalten sie DNA-Sequenzen, die sich hauptsächlich im pericentromischem Bereich der *Beta procumbens*-Chromosomen befinden. BACs der Klasse IV wurden nicht weiter betrachtet, da sie zwar spezifisch für das PRO1-Minichromosom, aber für die Centromeranalyse nicht relevant sind.

Erste Sequenzdaten lieferte die Sequenzierung der BAC-Enden der 24 BACs aus den Klassen I-III. Neun der resultierenden 48 Endsequenzen zeigen Homologien zu pflanzlichen LTR-Retrotransposons (Tab. 3.1). In zehn Fällen wurden Sequenzen der Satellitenrepeats pTS5 und pTS4.1 gefunden. Mit einem Anteil von neun BAC-Endsequenzen war die Homologie zur Hs1^{pro-1} Locus-DNA (Accessionsnummer Y12761) auffällig. Es zeigte sich dabei eine Verteilung in den Klassen I und II. Homologe Bereiche zu dieser Sequenz wurden nicht in den BAC-Enden der Klasse III gefunden. Deren Endsequenzen konnten durch die Datenbankrecherche kaum definiert werden. Für lediglich fünf der 18 BAC-Enden konnten in der EMBL-Datenbank homologe Sequenzen ermittelt werden. Zu drei Endsequenzen wurden Homologien zu kodierenden Sequenzen anderer Eukaryoten gefunden. So beinhaltet das SP6-Ende des BACs 99C14 Sequenzen, die Homologien zu kodierenden Sequenzen für die RNA-Polymerase aus Spinat aufweisen. Demnach besteht die Centromer-Region des PRO1-Minichromosoms nicht nur aus heterochromatischen repetitiven Sequenzen.

In der folgenden Tabelle (Tab. 3.1) sind neben den BACs der Klassen I-III die Sequenzen aus der EMBL-Datenbank aufgeführt, zu denen die BAC-Enden Homologien aufweisen.

Tab. 3.1: Charakterisierung der isolierten centromerischen BACs

Grau unterlegte Felder heben die in den experimentellen Arbeiten verwendeten BACs hervor.

Klone		Satelliten		BAC-Endsequenz		
Klasse	BAC	pTS5	pTS4.1	T7		
				Homologie (Accessionsnummer)	e-Value	e-Value
I	50C18	+	-	n.b.		
	51N23	+	-	n.b.		
	86O2	+	-	<i>B. procumbens</i> Hs1 ^{p10-1} Locus-DNA (Y12761)	7e ⁻¹⁷⁶	7e ⁻¹⁷⁶
	92G20	+	-	pTS5-Satellit		1e ⁻⁶⁴
	102A16	+	-	<i>B. procumbens</i> Hs1 ^{p10-1} Locus-DNA (Y12761)	7e ⁻¹⁷⁶	6e ⁻⁶⁴
	110G22	+	-	pTS5-Satellit		2,4e ⁻⁵
	124I17	+	-	<i>B. procumbens</i> Hs1 ^{p10-1} Locus-DNA (Y12761)	7e ⁻¹⁷⁶	7e ⁻¹⁷⁶
	125N12	+	-	<i>I. batatas</i> gag-pol Polyprotein (AAV88076)	2e ⁻³⁵	1e ⁻³⁵
	104N4	+	+	<i>B. procumbens</i> Hs1 ^{p10-1} LocusDNA (Y12761)	7e ⁻¹⁷⁶	7e ⁻¹⁷⁶
	104K14	+	+	pTS5-Satellit		
II	107I21	+	+	pTS5-Satellit		1e ⁻¹⁸
	112P23	+	+	pTS5-Satellit		7e ⁻¹⁷⁶
	123J2	+	+	pTS4.1-Satellit		
	126L8	+	+	<i>M. truncatula</i> gag-Protein (ABE78845)	3e ⁻⁷	
	127H9	+	+	pTS4.1-Satellit		7e ⁻¹⁷⁶
	99C14	-	+	<i>S. oleracea</i> RNA-Polymerase (ABD93711)	9e ⁻¹⁴	
	48B1	-	+	n.b.		
	97B8	-	+	<i>O. sativa</i> gag-pol Polyprotein	2e ⁻²⁸	5e ⁻²³
	106H12	-	+	n.b.		2e ⁻¹⁰
	114F13	-	+	n.b.		
III	116E16	-	+	n.b.		
	121K13	-	+	n.b.		
	126A5	-	+	n.b.		
	126D11	-	+	<i>M. truncatula</i> gag-Protein (ABE78845)	2e ⁻¹⁵	

n.b. – nicht bestimmbar; es wurden keine homologen Sequenzen in der EMBL-Datenbank identifiziert

3.1 Subklonierung von minichromosomspezifischen PRO1-BACs zur Identifizierung von Retrotransposon-Sequenzen

Neun selektierte BACs ließen sich durch das ausschließliche Vorkommen des pTS5-Satelliten (Klasse I) der „Core-Region“ des Centromers zuordnen. Durch Endsequenzierung wurden BACs selektiert, die Sequenzen mit Homologie zu pflanzlichen Retrotransposons zeigten (Tab. 3.1). Aus der Subklonierung des BACs 102A16 resultierten vier *Hind*III-Subklone, die bei der Datenbanksuche in EMBL und BLAST Homologien zu Bereichen aus pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons aus *Oryza sativa* (Kumekawa *et al.*, 2001; RIRE7, BAA89466), *Arabidopsis thaliana* (AAD19756), *Ananas comosus* (T07863) und *Sorghum bicolor* (AAD22153) aufwiesen. Die Homologie zu *del1-46*, einem umfassend charakterisierten Ty3-gypsy-Retrotransposon aus *Lilium henryi* (Smyth *et al.*, 1989; 1510387A) ermöglichte die Positionierung der Subklone (Abb. 3.3).

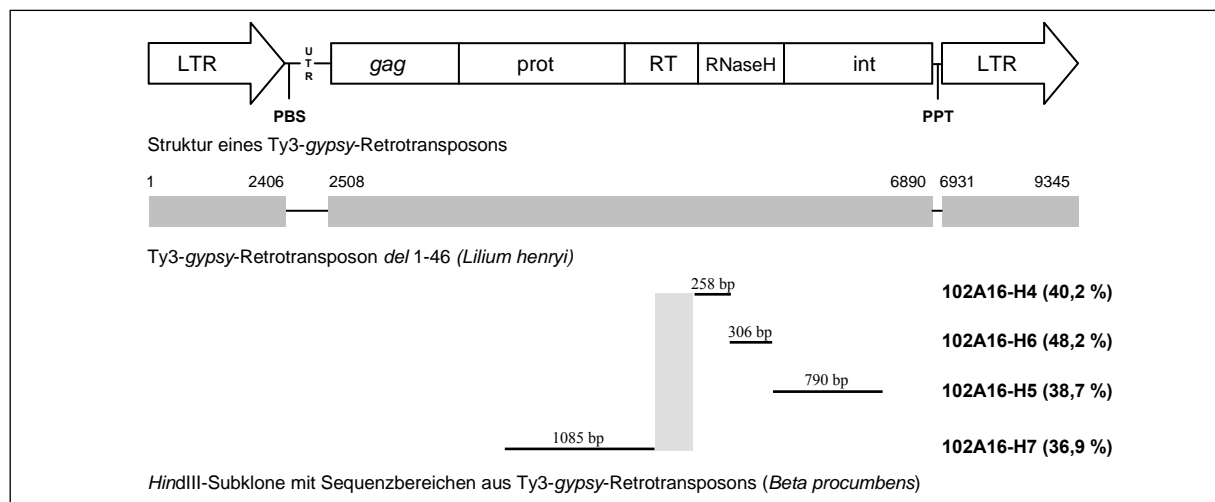


Abb. 3.3: *Hind*III-Subklone des BACs 102A16 kodieren Teile eines Ty3-gypsy-Retrotransposons
Schematische Darstellung der Lage und Größe klonierter *Hind*III-Subklone des BACs 102A16 durch Vergleich mit dem Ty3-gypsy-Retrotransposon *del 1-46* (Smyth *et al.*, 1989; 1510387A) aus *Lilium henryi*. Die Sequenzlücke zwischen den Subklonen 102A16-H7 und 102A16-H4 ist als kariertes Rechteck dargestellt. Der Grad der Homologie zum entsprechenden Sequenzbereich aus *del1-46* ist in Klammern angegeben.

3.2 Ermittlung der unbekannten Sequenzbereiche eines Ty3-gypsy-Retrotransposons

Nach Zuordnung der *Hind*III-Subklone zur Region des *gag-pol*-Polyproteins von Ty3-gypsy-Retrotransposons war eine Aussage über fehlende Sequenzbereiche und eine Abschätzung der Sequenzlängen möglich. Neben den begrenzenden LTR-Sequenzen fehlten die im 5'-Bereich liegende UTR (*untranslated region*), die sich direkt anschließende *gag*-Region, der 5'-Bereich der Protease, der 3'-Bereich der Reversen Transkriptase, sowie das 3'-Ende der Integrase.

3.2.1 Isolierung von Retrotransposon-Sequenzen durch PCR-Amplifikation

In der Anordnung der *HindIII*-Subklone an das *gag-pol*-Polyprotein von *dell-46* schienen die Subklone 102A16-H4, 102A16-H6 und 102A16-H5 direkt aufeinander zu folgen. Dies sollte durch das Ableiten von auswärts gerichteten Primern ermittelt werden. Weiterhin sollte die Sequenz zwischen den Subklonen 102A16-H7 und 102A16-H4 (Abb. 3.2, graues Rechteck), die auf 300 bp geschätzt wurde, auf diesem Weg untersucht werden. Die Sequenzierung klonierter CR-Produkte zeigte, dass die Subklone 102A16-H4, 102A16-H6 und 102A16-H5 direkt hintereinander liegen. Die Abfolge der Gene innerhalb dieses Subklon-Contigs von Reverser Transkriptase über RNaseH bis in die Integrase bestätigte die vorab durch Datenbanksuche recherchierte Einordnung dieser Sequenzen zu den Ty3-gypsy-Retrotransposons. Der resultierende Proteinbereich von 447 Aminosäuren wies im 3'-Bereich mehrere Stopcodons auf.

Die PCR-Primer ermöglichten weiterhin eine eingehende Charakterisierung der verbliebenen BACs der Klasse I (50C18, 51N23, 86O2, 92G20, 110G22, 124I17, 125N12; Tab. 3.1). Die Homologie von bis zu 98 % (Abb. 3.4) zwischen amplifizierten DNA-Sequenzen aus dem BAC 125N12 (Abb. 3.3, gepunktete Linien) und den entsprechenden Bereichen der Subklone des BACs 102A16 deuteten auf die Präsenz desselben LTR-Retrotransposons in diesen BACs hin. Im Folgenden wurde dieses Ty3-gypsy-Retrotransposon unter dem Namen *Beetle1* benannt.

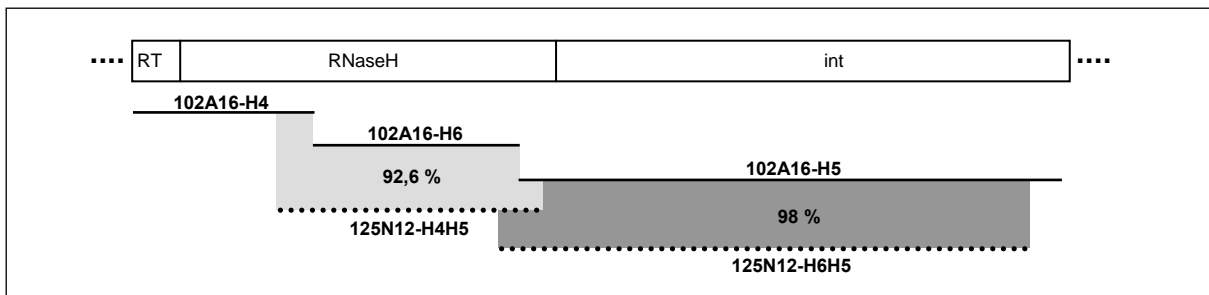


Abb. 3.4: PCR-Produkte des BACs 125N12 kodieren *Beetle1*-Sequenzen

Schematische Darstellung der Lage und Größe klonierter PCR-Produkte des BACs 125N12 (gepunktete Linie) und Homologie mit entsprechender Region aus den *HindIII*-Subklonen des BACs 102A16. Die Homologie der Amplikons zu den entsprechenden Regionen der *HindIII*-Subklone (grau) ist in Prozent angegeben

Die Sequenz zwischen den beiden Subklonen 102A16-H7 und 102A16-H4 im für die Reverse Transkriptase kodierenden Bereich (Abb. 3.3, graues Rechteck) konnte nicht aus dem BAC 102A16 amplifiziert werden. Demgegenüber zeigte die PCR mit DNA des BACs 125N12 ein Produkt (Abb. 3.5, gepunktete Linie), dass die Lücke mit 289 bp definiert.

Dieses klonierte und sequenzierte 555 bp lange PCR-Produkt 125N12-H7H6 (Abb. 3.5, gepunktete Linie) zeigte eine Homologie von 68,7 % mit den entsprechenden Sequenzbereichen aus den *HindIII*-Subklonen 102A16-H4 und 102A16-H6 (Abb. 3.5, dunkelgrau).

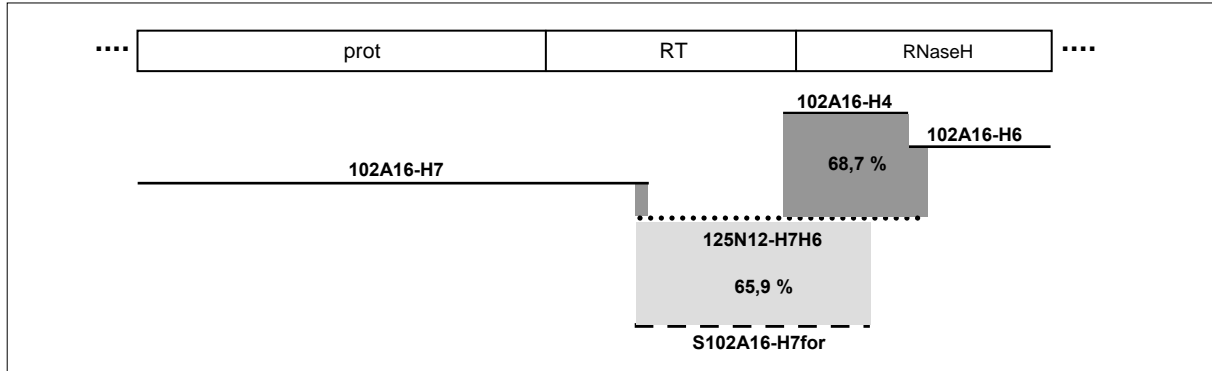


Abb. 3.5: PCR-Produkte des BACs 125N12 kodieren Sequenzen weiterer Ty3-gypsy-Retrotransposons
Schematische Darstellung der Lage und Größe des klonierten und sequenzierten PCR-Produkts 125N12-H7H6 (gepunktete Linie) des BACs 125N12 und der aus dem *Primer Walking* generierten Sequenz S102A16-H7for (gestrichelte Linie) des BACs 102A16. Die Homologiewerte mit den entsprechenden Regionen aus den *HindIII*-Subklonen ist angegeben.

3.2.2 Isolierung von Retrotransposon-Sequenzen durch direkte BAC-Sequenzierung

Eine weitere Strategie zur Ermittlung der unbekannten Sequenzen, vor allem innerhalb der Reverse Transkriptase-Region zwischen den Subklonen 102A16-H7 und 102A16-H4 lag in der direkten BAC-Sequenzierung. Dazu wurde aus dem Subklon 102A16-H7 heraus in 3'-Richtung sequenziert. Die generierte DNA-Sequenz S102A16-H7for war 556 bp lang (Abb. 3.5, gestrichelte Linie). Es wurden Sequenzhomologien von 63,9 % mit den betreffenden Sequenzen des Subklons 102A16-H4 ermittelt. Der Sequenzvergleich zwischen S102A16-H7for und dem PCR-Produkt 125N12-H7H6 aus dem BAC 125N12 (Abb. 3.5, gepunktete Linie) resultierte in einer Homologie von 65,9 %. Die Divergenzen ließen den Schluss zu, dass die DNA-Sequenzen aus den aufeinanderfolgenden *HindIII*-Subklonen 102A16-H4, 102A16-H6 und 102A16-H5 und dem Subklon 102A16-H7 nicht einer einzelnen Retrotransposon-Kopie zuzuordnen sind.

Das *Primer Walking* auf dem BAC102A16 stromabwärts der Integrase-Sequenz des *HindIII*-Subklons 102A16-H5 ergab neue Sequenzinformationen aus bisher unbekannten Ty3-gypsy-Retrotransposon-Sequenzen. Innerhalb der 357 bp langen Sequenz konnte ein Polypurintrakt (PPT) mit der Basenabfolge 5'-AGGGGAGAA-3' identifiziert werden. Zudem war die Analyse erster Sequenzen aus dem 5'-Bereich des 3'-LTR von *Beetle1* gegeben. Das für das

5'-Ende von LTRs charakteristische Dinukleotid TG wurde direkt nach dem PPT identifiziert. Die Datenbankrecherche der partiellen 3'-LTR-Sequenz zeigte eine 99,6 %ige Homologie zu Sequenzbereichen der *B. procumbens* Hs1^{pro-1} Locus-DNA (Sandal *et al.*, 1997; Y12761). Dieser 1956 bp lange AFLP-Marker umfasste einen Solo-LTR, der in einem Block des tandemartig angeordneten centromerischen pTS5-Satelliten vorliegt (Abb. 3.6).

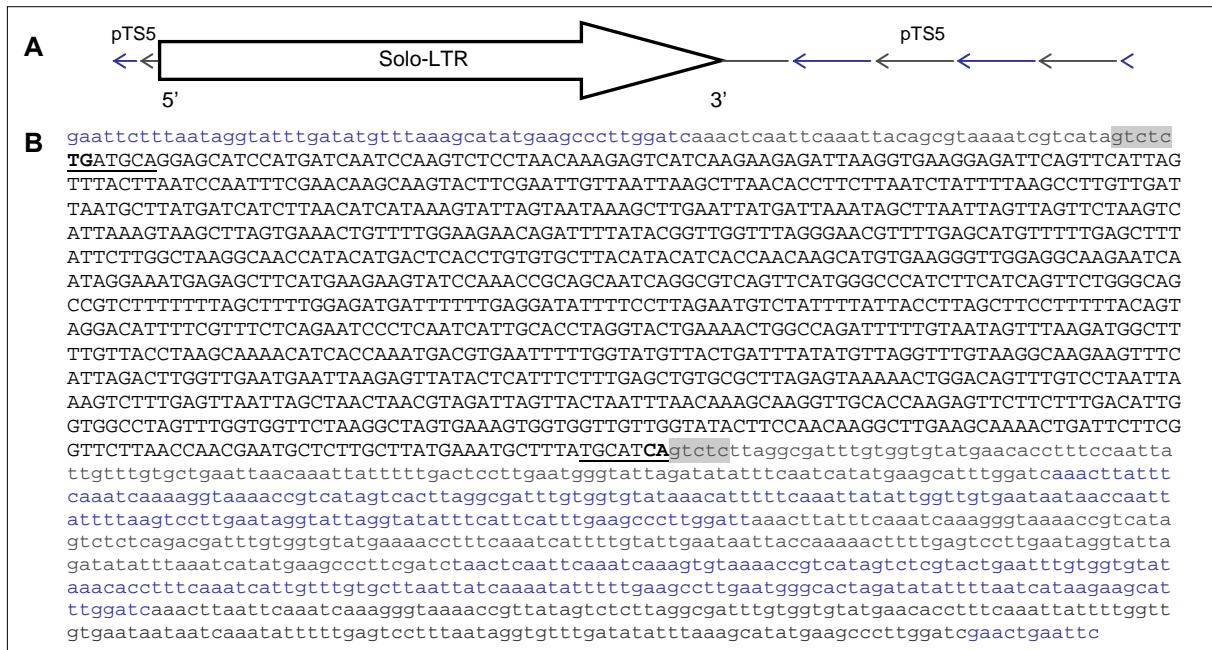


Abb. 3.6: Interspersion eines Beetle1-LTRs mit dem pTS5-Satelliten innerhalb der Hs1^{pro-1} Locus-DNA
A) Schema der Sequenzstruktur der Hs1^{pro-1} Locus-DNA (Y12761). Die einzelnen pTS5-Einheiten sind abwechselnd blau und grau dargestellt; die Pfeilspitze kennzeichnet die 5'→3'-Orientierung. Der Solo-LTR ist schwarz abgebildet. B) Sequenz der Hs1^{pro-1} Locus-DNA; einzelne pTS5-Einheiten sind blau und grau, die Sequenz des LTRs schwarz und in Großbuchstaben aufgeführt. Die typischen Dinukleotide TG am 5'-Ende und CA am 3'-Ende sind fett und Bestandteil der unterstrichenen invertierten Sequenzwiederholung. Die Target-Site-Duplikation (TSD) ist grau unterlegt.

Die charakteristischen Dinukleotide TG am 5'-Ende des LTRs und CA am 3'-Ende wurden identifiziert. Das Solo-LTR ist 1089 bp lang und besitzt typische invertierte Sequenzwiederholungen von sieben Basenpaaren. Es wurde ein PPT-Primer abgeleitet, der in Kombination mit dem Satelliten-Primer pTS5 rev die Amplifikation eines vollständigen 3'-LTRs aus dem BAC 102A16 ermöglichte. Die Sequenzierung des klonierten Amplikons zeigte, dass diese LTR-Sequenz Bestandteil von *Beetle1* ist.

3.2.3 Inverse PCR zur Analyse LTR-flankierender Sequenzbereiche

Die Kenntnis der LTR-Sequenz von *Beetle1* bot die Möglichkeit an durch inverse PCR einen Einblick in die LTR-flankierenden Sequenzbereiche zu erhalten. Die Lage der in Abbildung 3.7 A dargestellten LTR-Primer sollte nach *Hind*III-Restriktion genomischer DNA von PRO1 und *Beta procumbens* zum einen die Amplifikation interner *Beetle1*-Bereiche, die sich

stromabwärts des 5'-LTR anschließen, ermöglichen. Zum anderen sollte die Analyse von Integrationsorten nach dem 3'-LTR gegeben sein. Für die inverse PCR wurde die restringierte DNA durch Agarosegelelektrophorese größenfraktioniert. Ein Bereich zwischen 250 bp und 2 kb wurde aus dem Gel eluiert und zu einer Ringstruktur ligiert (Abb. 3.7 B).

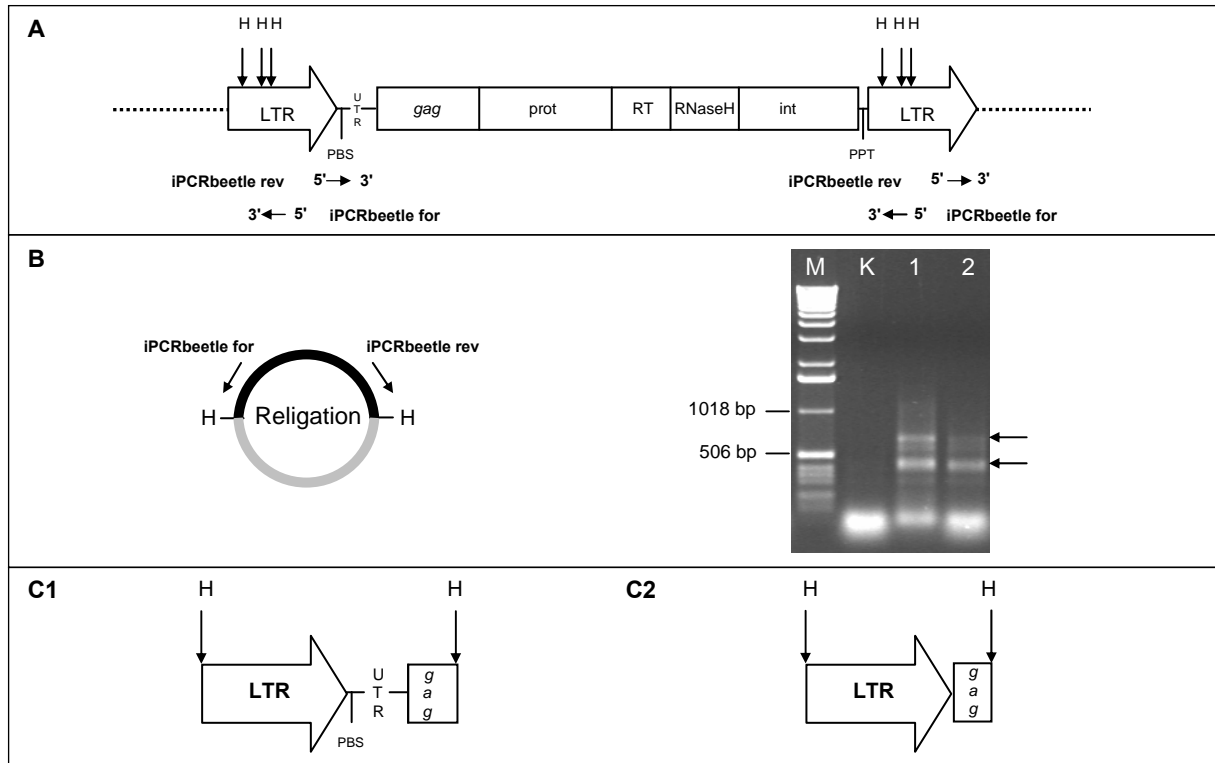


Abb. 3.7: Analyse LTR-flankierender Sequenzbereiche durch Inverse PCR

A) Ausgerichtet an der Gesamtstruktur des *Beetle1*-Retrotransposons sind die LTR-Primer in 5'→3'-Richtung eingezeichnet; *HindIII*-Schnittorte (H) sind durch einen senkrechten Pfeil und genomische DNA durch eine gepunktete Linie dargestellt. B) Nach *HindIII*-Restriktion und Ligation der Restriktionsfragmente konnten flankierende Sequenzabschnitte (grau) unter Verwendung der *Beetle1* LTR-Primer iPCRbeetle for und rev amplifiziert werden. Das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel zeigt die PCR-Amplifikate aus *B. procumbens* (1) und PRO1 (2); die Kontrolle (K) enthielt keine DNA. C1 und C2) Darstellung der DNA-Sequenzen, die aus der Amplifikation mit den LTR-Primern aus den ligierten *HindIII*-Restriktionsfragmenten resultierten.

Die zirkulären Restriktionsfragmente wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt, die unter Verwendung der Primer iPCRbeetle for und iPCRbeetle rev die Amplifikation der LTR-flankierenden Regionen ermöglichte. Das Gelbild der resultierenden PCR-Produkte zeigte mehrere Amplikons, die unterschiedliche Intensitäten aufwiesen. Die in der Abbildung 3.7 B im Gelbild mit Pfeilen gekennzeichneten Amplikons wurden kloniert und sequenziert. Der mitgeführte Reaktionsansatz mit genomischer DNA von *B. vulgaris* (K) zeigte mit den Primern keine Amplikons.

Die Sequenzauswertung der klonierten PCR-Produkte zeigte die in Abbildung 3.7 C1 und C2 dargestellten Strukturen, wobei es sich um bisher uncharakterisierte interne Sequenzen von *Beetle1* handelte, die stromabwärts des 5'-LTR liegen. Das untersuchte 662 bp lange PCR-

Amplikon (Abb. 3.7 C1) enthielt neben 274 bekannten Basenpaaren aus dem *Beetle1*-LTR neue *Beetle1*-Sequenzen. Zwei Basenpaare nach dem 5'-LTR schloß sich eine potentielle Primerbindungsstelle (PBS) mit Homologie zum Motiv der Initiator-tRNA Methionin an. Diese neben dem PPT für die reverse Transkription benötigte Primerbindungsstelle ist 15 Basen lang und weist die Sequenzabfolge 5'- TGGTATCAGAGCTTT-3' auf. Die Nukleotide 455-457 markierten mit ATG ein Startcodon und bildeten mit den folgenden 69 kodierenden Aminosäuren einen durchgehenden ORF, der einen Teilabschnitt der putativen *gag*-Region von *Beetle1* zuzuordnen ist. Die stromaufwärts des Startcodons gelegenen Nukleotide bilden die 180 bp umfassende untranslatierte Region (UTR).

Im 483 bp langen PCR-Amplikon (Abb. 3.7 C2) hingegen konnte nach dem CA-Dinukleotid am 3'-Ende des *Beetle1*-LTRs keine PBS-Sequenz identifiziert werden. Zudem wies die sich nach dem *Beetle1*-LTR anschließende Basenabfolge über 209 bp keine Homologie zur im PCR-Produkt C1 identifizierten *Beetle1*-UTR auf. In späteren Analysen konnte diese Sequenz einem bisher unbekannten Abschnitt der *gag*-Region von *Beetle1* zugeordnet werden, was auf die Deletion der UTR-Sequenz schließen lässt.

Die bisher gewonnenen Sequenzdaten von PBS und PPT von *Beetle1* ermöglichten die Entwicklung elementspezifischer Primer. Mit den Primern *Beetle1_PBS* for und *Beetle1_PPT* rev konnte das vollständige *gag-pol*-Polyprotein von *Beetle1* überspannt werden. Das aus *B. procumbens* amplifizierte PCR-Produkt besitzt eine Größe von 4568 bp.

3.3 Nachweis der Existenz vollständiger *Beetle1*-Kopien in BAC-Klonen

Die neun BACs der Klasse I (Tab. 3.1) wurden auf die Anwesenheit des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* getestet (Abb. 3.8). Nur vier BACs (51N23 [2], 92G20 [4], 110G22 [7], 125N12 [9]) zeigten ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 4568 bp (Abb. 3.8, Pfeil).

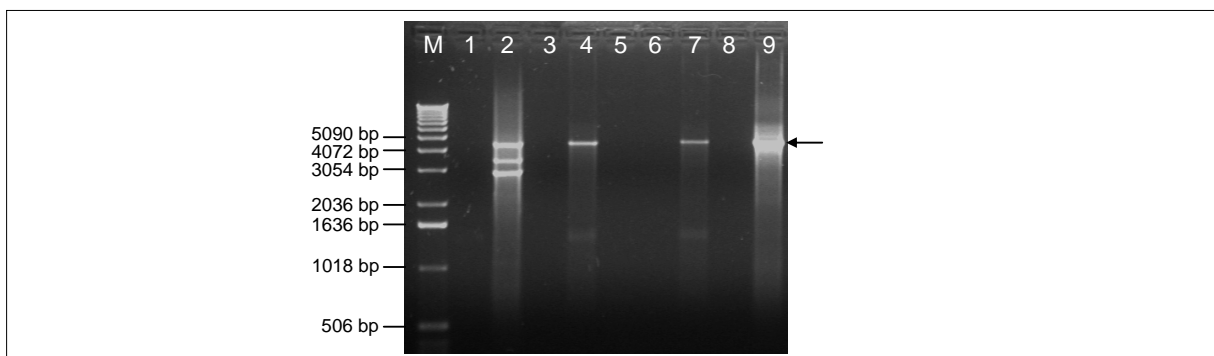


Abb. 3.8 : Amplifikation des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* in BACs der Klasse I

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den aus den Primern *Beetle1_PBS* for und *Beetle1_PPT* rev resultierenden Amplikons. Das Amplikon ist 4568 bp groß (Pfeil) und überspannt den vollständigen *gag-pol*-Bereich. Als Template dienten BACs der Klasse I 50C18 (1), 51N23 (2), 86O2 (3), 92G20 (4), 102A16 (5), 104N4 (6), 110G22 (7), 124I17 (8) und 125N12 (9).

Aus der PCR mit dem BAC 51N23 (Abb. 3.8 B; Spur 2) resultierten zwei weitere PCR-Produkte. Diese Amplikons waren mit ca. 3200 bp und 2800 bp deutlich kleiner als der von den LTRs eingerahmte interne *Beetle1*-Bereich. Diese kürzeren Amplikons im Rahmen der Analyse von Sequenzdeletionen im Kapitel 3.12 untersucht.

Der BAC 102A16 (Abb. 3.8 B; Spur 5), von dem die ersten *Beetle1*-Sequenzen gewonnen wurden, wies nach der PCR mit den PBS/PPT-Primern kein Produkt auf. Somit ist die Anwesenheit einer vollständigen *Beetle1*-Kopie unwahrscheinlich. Für die Isolation einer vollständigen *Beetle1*-Kopie wurde der BAC 125N12 (Abb. 3.8 B; Spur 9) eingesetzt, da er vollständige *gag-pol*-Sequenzen aufweist und durch vorangegangene Klonierungen (Abb. 3.4, Abb. 3.5) Teilsequenzen von *Beetle1* bekannt waren.

3.3.1 *Beetle1* ist als Amplikon-Contig vollständig darstellbar

Da bisherige Sequenzanalysen das Vorkommen interner *HindIII*-Schnittorte in *Beetle1* zeigten, wurde der BAC125N12 mit *HindIII* subkloniert. Die erzeugten Subklone lieferten Sequenzdaten aus unterschiedlichen Bereichen des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1*. Dies ermöglichte die Entwicklung von Primern aus der *Beetle1*-Kopie dieses BACs. Zudem sollte unter der Annahme einer Interspersion des *Beetle1*-Elements mit dem Satelliten pTS5, wie sie innerhalb des *Hs1^{pro-1}*-Locus (Abb. 3.6) identifiziert wurde, die Amplifikation eines vollständigen *Beetle1*-Elements inklusive der 3'- und 5'-LTR-Sequenzen gegeben sein.

Es erfolgten elf Reaktionsansätze, die unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen die Klonierung der Sequenzen eines vollständigen *Beetle1*-Retrotransposons ermöglichen sollten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die jeweiligen Sequenzabschnitte nicht nur durch ein Amplikon abgedeckt wurden, sondern durch ein Amplikon-Contig möglichst eine Mehrfachanalyse der Sequenzen gegeben war (Abb. 3.9).

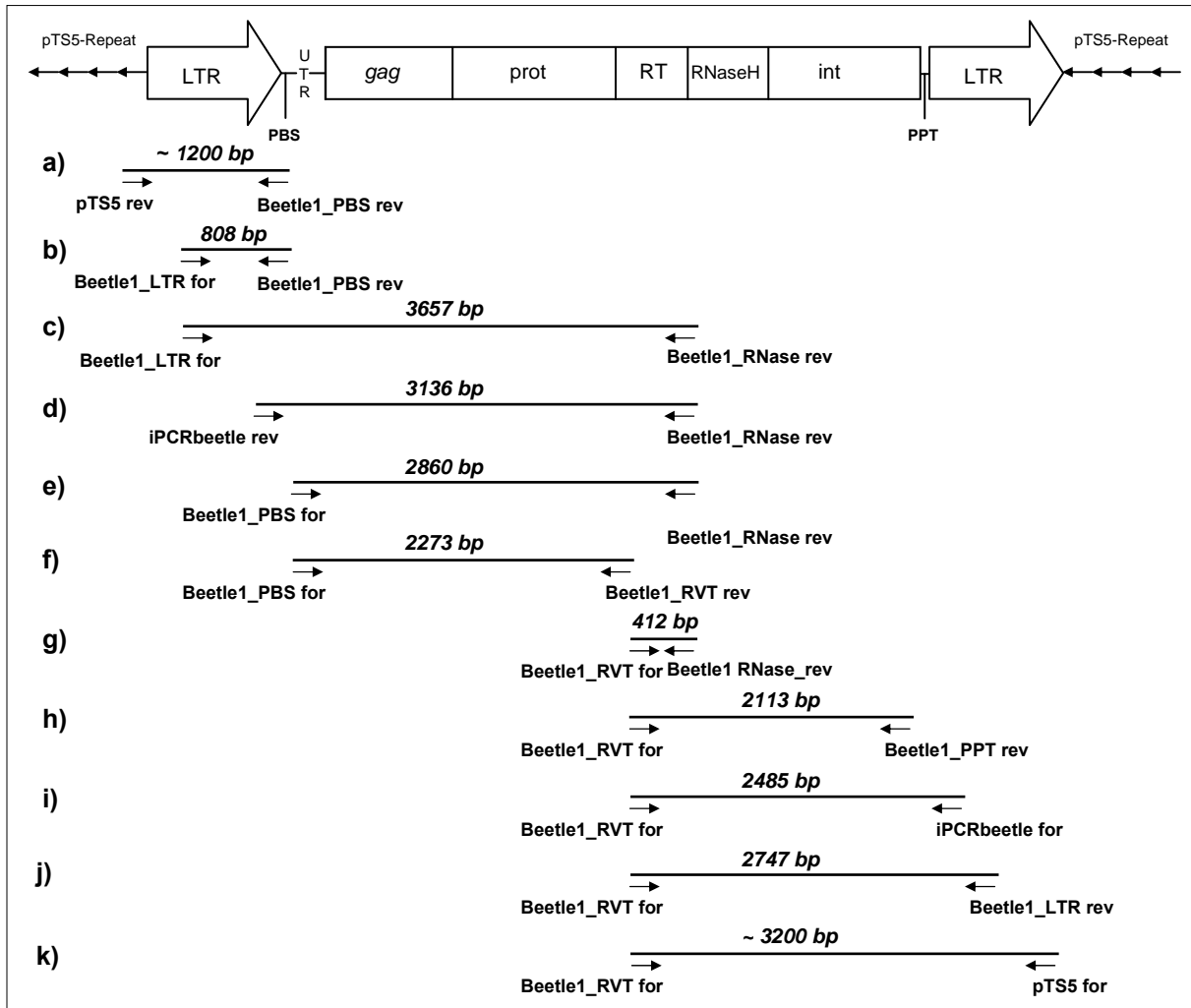


Abb. 3.9: PCR-System zur Amplifikation eines vollständigen *Beetle1*-Retrotransposons

Primerlage und erwartete Amplikons (a-k) im Vergleich zur Gesamtstruktur eines *Beetle1*-Retrotransposons. Bei der Amplifikation vollständiger LTR-Bereiche wurde von einer Integration des Retrotransposons in den pTS5-Satelliten ausgegangen. Die Orientierung der Primer in 5'→3'-Richtung ist durch einen Pfeil dargestellt. Die zu erwartende Produktgröße ist kursiv über dem amplifizierten Sequenzabschnitt (Linie) angegeben.

Im resultierenden Gelbild (Abb. 3.10) zeigten sich Amplikons, die im erwarteten Größenbereich lagen.

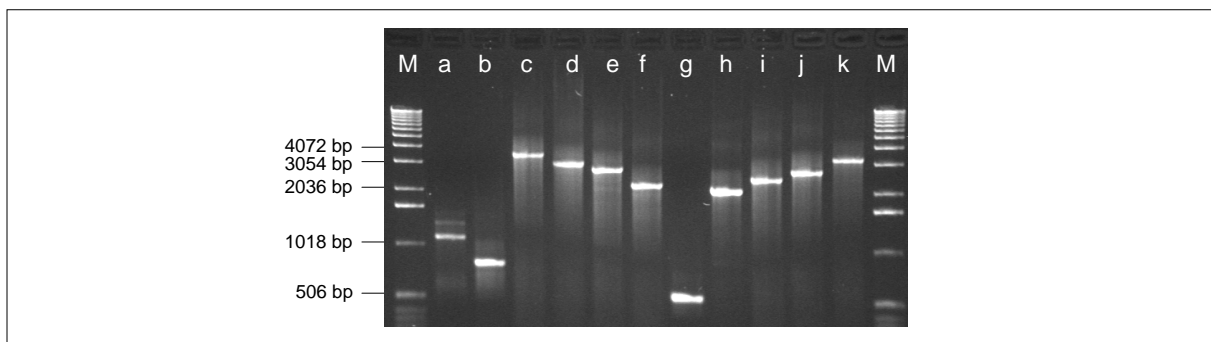


Abb. 3.10: Amplikon-Contig über ein vollständiges *Beetle1*-Retrotransposon

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den Amplikons der in Abb. 3.4 dargestellten Primerkombinationen. Als Template diente Plasmid-DNA des BACs 125N12, welcher eine vollständige *Beetle1*-Kopie besitzt.

3.3.2 *Beetle1* liegt in mehreren Kopien auf dem BAC 125N12 vor

Die entstandenen PCR-Produkte des BACs 125N12 wurden kloniert. Die Sequenzierung von vier Plasmidklonen mit Sequenzen, die aus der Primerkombination *Beetle1*_RVT for und rev (Abb. 3.8, g; Abb. 3.9, g) resultierten, zeigte vier Sequenzvarianten (Abb. 3.11). Die Divergenzen von bis zu 2,2 % deuteten auf die Präsenz mehrerer *Beetle1*-Kopien auf dem BAC 125N12 hin.

125N12-G1	CATGCATGAGGTACTTCGTCCCTTCATTGGTTTCATTGTTGTGGTTTATTTTGATGATATCTTGTGTATAGCAACAATGAACAG	85
125N12-G2T.....G.....G.....	85
125N12-G3T.....G.....G.....	85
125N12-G4T.....G.....G.....	85
125N12-G1	GATCATCTTATTCATCTGAAGAAGGTTTCTTAAGCTAAGGGAAAAGAAGTTATATGCAAAGATGGAGAAGTGTGAATTCTTCA	170
125N12-G2C.....	170
125N12-G3C.....	170
125N12-G4C.....	170
125N12-G1	CTTCTAGTGTCTTTTCTTGGCTTCATTATTTTCATCTCAGGGCATTTCATATGGATGAATCCAAGGTGGAGGCAATCAAATCATG	255
125N12-G2T.....T.....T.....	255
125N12-G3T.....T.....	255
125N12-G4T.....T.....	255
125N12-G1	GCCAATTCCAAAGTCCATCACAGAAGTTCGAAGTTTTCATGGATTGGCATCTTTTACAGGAGATTTCATCAGAGGTTTGTAGTACT	340
125N12-G2	340
125N12-G3G.....G.....C.....	340
125N12-G4G.....G.....	340
125N12-G1	ATTTTGGCTCCACTGACCGAATGTATCAAAGGGGGTTCTTTCACTTGGACTCCAGCAGCTCAGGAAGCATT	412
125N12-G2	412
125N12-G3	412
125N12-G4T.....	412

Abb. 3.11: Homologievergleich zwischen Amplikons aus dem Reverse Transkriptase-Bereich von *Beetle1*

Die vier Amplikons aus dem BACs 125N12 resultierten aus der Amplifikation mit den Primern *Beetle1*_RVT for und *Beetle1*_RNase rev. Als Referenzsequenz wurde die Basenabfolge des Plasmid- Klons 125N12-G1 gesetzt. Homologe Sequenzbereiche sind durch einen Punkt wiedergegeben.

3.4 Isolation eines vollständigen *Beetle1*-Retrotransposons

Der Nachweis mehrerer Kopien von *Beetle1* auf dem BAC 125N12 erlaubte keine überspannende PCR-Amplifikation eines einzelnen *Beetle1*-Elements, da die PCR-Produkte unterschiedlichen Element-Kopien entstammen können. Zudem ist durch die PCR-Analysen nur die Integration in den pTS5-Satelliten nachweisbar, jedoch können keine Kenntnisse über weitere Integrationsorte und flankierende Sequenzen einschließlich der *Target-Site*-Duplikation (TSD) erlangt werden.

Diese Gründe führten dazu *Fingerprint*-Filter des BACs 125N12 durch Southern-Hybridisierung auf die Anwesenheit von Restriktionsfragmenten zu testen, die große Bereiche eines *Beetle1*-Elements oder sogar eine vollständige Kopie beinhalten.

3.4.1 Identifizierung eines BAC-Restriktionsfragments mit einer vollständigen *Beetle1*-Kopie

Mit Hilfe Die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Xba*I restringierte BAC-DNA wurde mit klonierten *Beetle1*-Sequenzen aus konservierten Bereichen für die *gag*-Region, Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase und den LTR hybridisiert (Abb. 3.12).

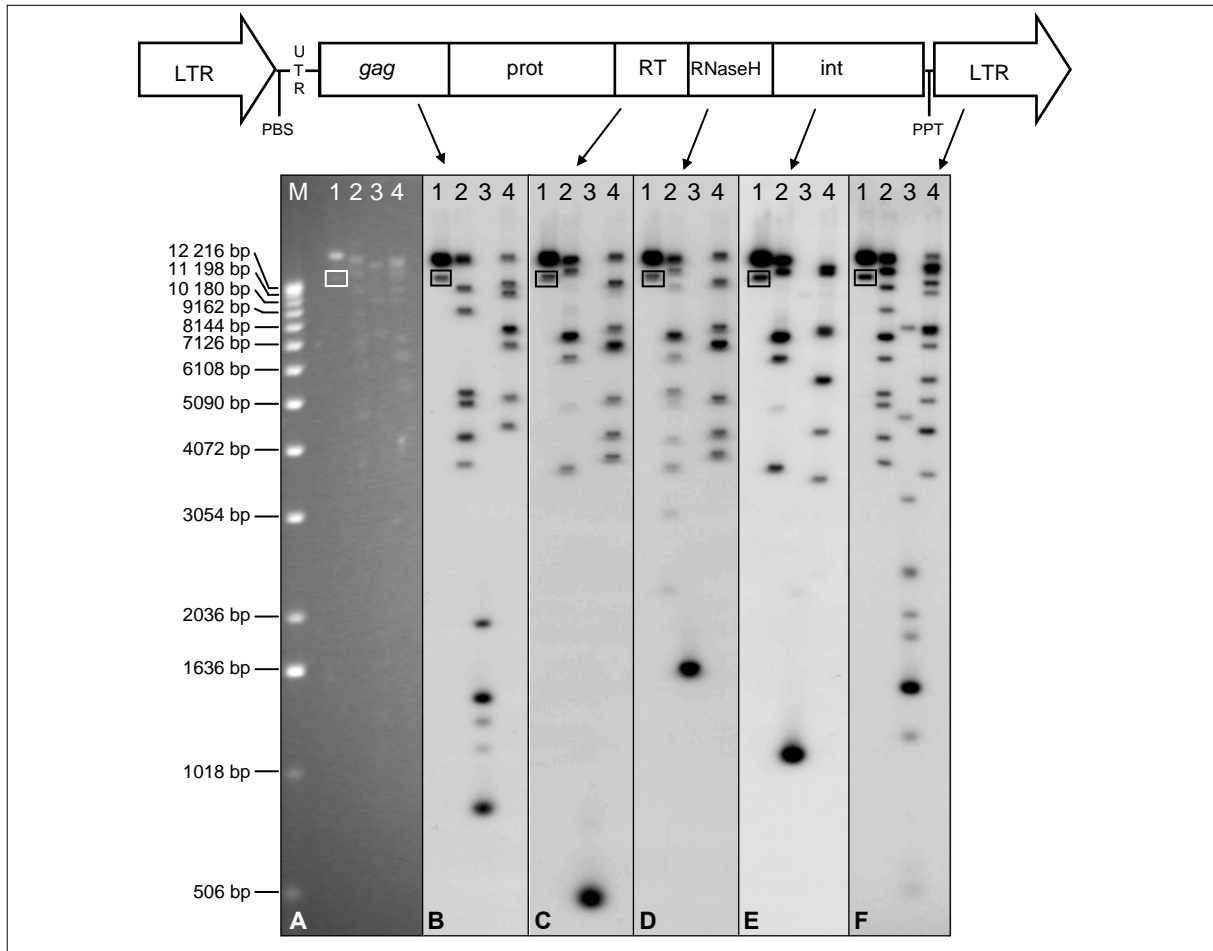


Abb. 3.12: Southern-Analyse zur Identifizierung eines Restriktionsfragments, welches ein vollständiges *Beetle1*-Retrotransposon aufweist

A) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit restringierter DNA vom BAC 125N12. Die BAC-DNA wurde mit *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Hind*III (3) und *Xba*I (4) geschnitten. B) Autoradiogramm des Southern-Filters nach Hybridisierung mit der *gag*-Region (B), der Reverse Transkriptase (C), der RNaseH (D), der Integrase (E) und dem LTR von *Beetle1*. Das eingerahmte *Bam*HI-Fragment zeigte nach Hybridisierung mit allen DNA-Sonden ein Hybridisierungssignal.

Die radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisierten mit DNA-Fragmenten aus allen vier Restriktionsansätzen. In Spur 1 konnte ein *Bam*HI-Fragment (Abb. 3.12, B-F; Einrahmung) identifiziert werden, das mit allen verwendeten *Beetle1*-Sonden hybridisierte. Der Vergleich mit dem Größenmarker zeigte eine Größe dieses Restriktionsfragment von über 15 kb, sodass es durchaus eine vollständige *Beetle1*-Kopie und zudem benachbarte Sequenzen enthalten könnte. Die Klonierung des präparativ durch Elektroelution isolierten *Bam*HI-Fragments

erfolgte in den BAC-Vektor pBeloBAC11, der für die Klonierung großer DNA-Fragmente gut geeignet ist. Mehr als 200 Bakterienklone wurden nach der Transformation selektiert, jedoch wurde in der Koloniehybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR, einer DNA-Sonde aus der *gag*-Region und der Integrase nur zwei positive BACs selektiert. Die BACs 1D4 und 2C11 wurden mit SP6- und T7-Primern ansequenziert. Auch nach wiederholten Versuchen ließ sich lediglich der Klon 2C11 vom SP6-Ende sequenzieren.

Durch die geringe Klonierungseffizienz des *Bam*HI-Fragments und die experimentell nicht erklärbare schlechte Sequenzierbarkeit der BACs 1D4 und 2C11 wurden die Klonierungsversuche des *Bam*HI-Fragments eingestellt. Zur Isolation eines vollständigen *Beetle1*-Retrotransposons wurde das *Bam*HI-Fragment durch Elektroelution aus dem Agarosegel zurückgewonnen und mit *Hind*III und *Eco*RI subkloniert. Daraus resultierten sechs *Hind*III-Subklone und ein *Eco*RI-Subklon, deren Bezeichnung und Größe in Tabelle 3.2 aufgeführt ist.

Tab. 3.2: Klonbezeichnung und Länge selektierter Subklone des *Bam*HI-Fragments

Klonbezeichnung	Sequenzlänge
BF- <i>Hind</i> III-1	305 bp
BF- <i>Hind</i> III-2	87 bp
BF- <i>Hind</i> III-3	432 bp
BF- <i>Hind</i> III-4	2533 bp
BF- <i>Hind</i> III-5	87 bp
BF- <i>Hind</i> III-6	3798 bp
BF- <i>Eco</i> RI-5	4724 bp

Die sequenzierten Subklone wurden an die aus dem Amplikon-Contig (Abb. 3.9) bekannte Struktur von *Beetle1* angeordnet. Daraus resultierte die in Abbildung 3.13 dargestellte Restriktionskarte, die einen 6873 bp umfassenden Teilbereich des *Bam*HI-Fragments charakterisiert.

Weitere Sequenzinformationen ergaben sich aus der SP6-Endsequenz des BACs 2C11. Diese 498 bp lange Sequenz war am 3'-Ende mit 224 bp aus dem 3'-Bereich des bereits charakterisierten 5'-LTR von *Beetle1* aus dem Subklon BF-*Eco*RI-5 identisch. Die Primerkombination aus dem elementspezifischen Primer *Beetle1_PPT* for und dem Vektorprimer SP6 (Abb. 3.13, gepunktete waagerechte Linie) ermöglichte die Amplifikation des vollständigen 3'-LTRs aus dem BAC 2C11. Dadurch konnten insgesamt 8015 bp des *Bam*HI-Fragments aufgeklärt werden.

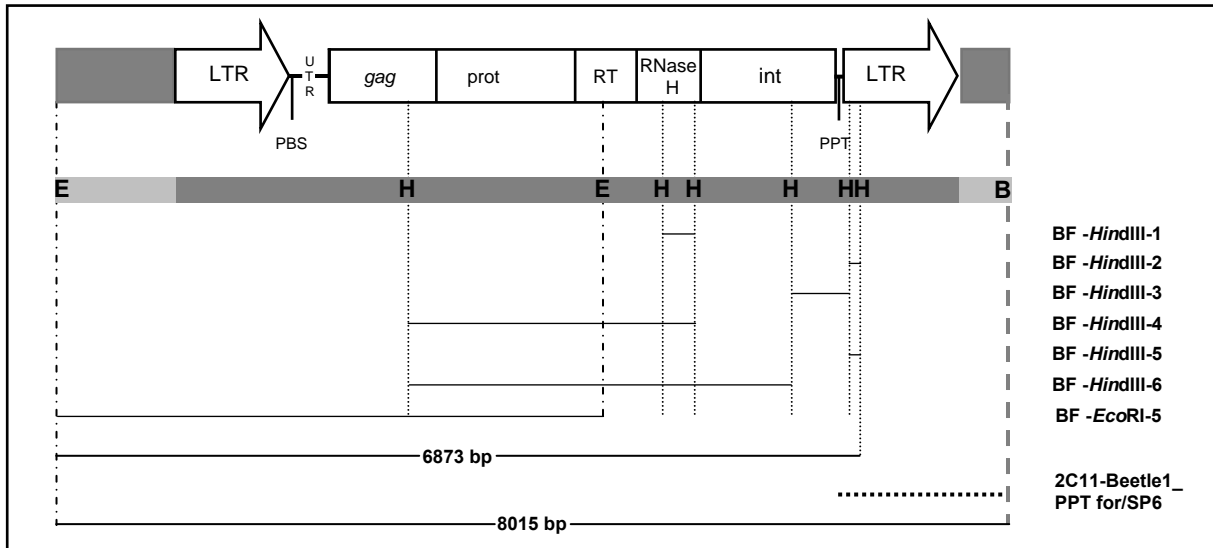


Abb. 3.13: Restriktionskarte des *Bam*HI-Fragments aus dem BAC 125N12

Maßstabsgetreue Darstellung der Subklone, die aus der Subklonierung des *Bam*HI-Fragments resultierten. Das Schema zeigt die Größe und Anordnung der Subklone innerhalb des *Bam*HI-Fragments. Die gepunkteten Längslinien zeigen die internen *Hind*III-Schnittorte (H) und die gestrichelt-gepunkteten Linien die *Eco*RI-Schnittorte (E). Einer der *Bam*HI-Schnittorte (B; grau gestrichelte Linie) konnte am SP6-Ende des BACs 2C11 identifiziert werden.

Neben der vollständigen DNA-Sequenz einer definierten *Beetle1*-Kopie mit einer Gesamtlänge von 6736 bp (Abb. A1, Anhang) konnten zusätzlich Aussagen über den Integrationsort einschließlich der TSD getroffen werden.

3.4.2 Molekulare Charakterisierung des LTR-Retrotransposons *Beetle1*

Das Retrotransposon *Beetle1* hat eine Gesamtlänge von 6736 bp und wird von LTR-Sequenzen begrenzt, die eine Länge von 1091 bp (5'-LTR) bzw. 1089 bp (3'-LTR) aufweisen. Beide LTRs werden von der konservierten inversen Sequenz 5'-TG...CA-3' begrenzt, die Bestandteil der sieben Basenpaar langen invertierten Sequenzwiederholung 5'-TGATGCA....TGCATCA-3' ist.

Das *gag-pol*-Polyprotein umfasst einen durchgehenden ORF von 1504 Aminosäuren. Dieser reicht bis in den 3'-LTR hinein und ist von einer stromaufwärts gelegenen untranslatierten Region (UTR) mit einer Länge von 180 bp durch ein Startcodon abgrenzbar. Die Anordnung der Gene im *gag-pol*-Polyprotein (*gag*-Protease-Reverse Transkriptase/RNaseH-Integrase) zeigt den typischen Aufbau eines Ty3-gypsy-Retrotransposons.

Stromabwärts vom 5'-LTR befindet sich die für die Initiation der Reversen Transkription notwendige Primerbindungsstelle (PBS), die eine Homologie zum tRNA-Motiv der Aminosäure Methionin aufweist. Die Homologie der PBS erstreckt sich über eine Region von 15 bp zum 3'-Ende der tRNA und beginnt mit der für das 3'-Ende einer tRNA

charakteristischen Basenabfolge TGG. Vor dem 3'-LTR befindet sich ein Polypurinbereich (PPT) aus neun Purinen 5'-AGGGGAGAA-3', der als Primer für die Zweitstrangsynthese der cDNA benötigt wird. Die wesentlichen Daten von *Beetle1* sind in Abbildung 3.14 übersichtsartig dargestellt.

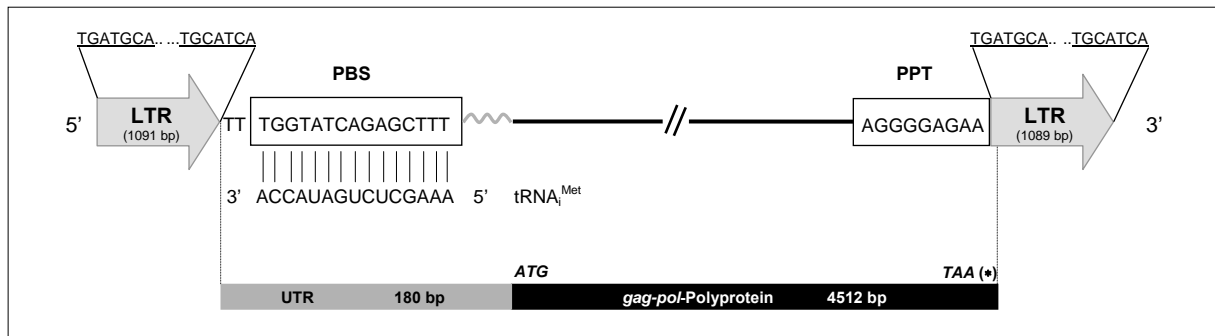


Abb. 3.14: Strukturelle Bereiche des Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1*

Die terminalen Pfeile an beiden Enden von *Beetle1* repräsentieren die begrenzenden LTRs des Retrotransposons. Oberhalb des Retroelements sind die sieben Basenpaar langen invertierten Sequenzwiederholungen innerhalb jedes LTRs dargestellt. Die Sequenzen für die Primerbindungsstelle (PBS) und den Polypurinbereich (PPT) sind eingerahmt. Die zum 3'-Ende der Initiator tRNA Methionin komplementären Basen der PBS sind durch Linien verbunden. Die Position und Länge des *gag-pol*-Polypeptins (schwarzes Rechteck) und der vorgeschalteten untranslatierten Region (UTR; graues Rechteck) sind im unteren Abbildungsteil in farbig gefüllten Rahmen dargestellt. Das Startcodon ist durch ATG markiert, das Stoppcodon resultiert aus TAA (*).

Da die LTR-Sequenzen durch die Analyse des *Bam*HI-Fragments für eine *Beetle1*-Kopie definierbar waren, war ein Sequenzvergleich zwischen vollständigem 5'- und 3'-LTR (Abb. 3.15) möglich.

Der 3'-LTR wies neben zwei Deletionen (Pos. 282; 789) zwei Basenpaarsubstitutionen (Pos. 325; 342) auf und war zu 99,6 % mit dem 5'-LTR homolog. Mit der Anwesenheit einer Initiator (Inr)-Sequenz (Pos. 624-630) konnte eine wichtige Promotorkomponente innerhalb des *Beetle1*-LTR identifiziert werden. Ein Motiv für eine TATA-Box wurde nicht gefunden. An der Basenpaarposition 213-218 wurde das Polyadenylierungssignal 5'-AATTAAA-3' identifiziert, das in der U3-Region des LTRs lokalisiert ist und nur im 3'-LTR von funktioneller Bedeutung ist.

5' LTR	TGATGCAGGAGCATCCATGATCAATCCAAGTCTCCTAACAAAGAGTCATCAAGAAGAGATTAAGGTGAAGGAGATTCACT	80
3' LTR	80
5' LTR	TCATTAGCTTACTTAATCCAATTTGGAACAAACAAGTACTTCAATGTTAATTAAGCTTAACACCTTCTTAATCTTTT	160
3' LTR	160
	A	
5' LTR	TAAGCCTTGTGATTAATGCTTATGATCATCTTAACATCATTAAGTATTAGT AATAA AGCTTGAATTATGATTAAATAGC	240
3' LTR	240
5' LTR	TTAATTAGTTAGTTCTAAGTCATTAAAGTAAGCTTAGTGAACTGTTTTGGAAGAACAGAATTTATACGGTTTGTTTAGG	320
3' LTR	320
5' LTR	GCACGTTTTGGCTACGTTTTTTAGCTTTATTCTTGGCTAAGGCAACCATAACATGACTCACCTGTGTGCTTACATACATCA	400
3' LTRA.....G.....	399
5' LTR	CCAACAAGCATGTGAAGAGTTGGAGGCAAGAATCAATAGGAAATGAGAGCTTCATGGAGAAGTATCCAAAACCGCAGCTG	480
3' LTR	479
5' LTR	GGAGGCGTCATTCTGGGTCCTCTTCATCAGTTCTGGGCAGCCGCTTTTTTTTAGCTTTTGGAGCTGATTTTTTGAGGAT	560
3' LTR	559
	B	
5' LTR	ATTTTCCTTAGAATGTCTATTTTAATACCTTAGCTTCCTTTTGCAGTAGGACATTTTCGTTT CTCAGA ATCCCTCAATC	640
3' LTR	639
5' LTR	ATTGCACCTAGGTACTGAAAAGTGGCCAGATTTTGTAAATAGTTTAAGATGGCTTTTGTTACCTAAGCAAAACATCACCA	720
3' LTR	719
5' LTR	AATGACGTGAATTTTTGGTATGTTACTGCTTTATATGTTAGGTTTGTAAAGCAAGAAGTTTGATTAGACCTTTGTTGAAT	800
3' LTR	798
5' LTR	GAATTAAGAGTTATACTCATTTCTTTGAGCTGTGCGCTTAGAGCAAAAAGTGGACAGTTTGTCTTAATTAAAGTCTTTGA	880
3' LTR	878
5' LTR	GTTAATTAGCTAACTAACGTAGATTAGTTACTAATTTAACAAAGCAAGGTTGCACCAAGAGTTCTTCTTTGACATTGGTG	960
3' LTR	958
5' LTR	GCCTAGTTTGGTGGTCTTAAGGCTAGTGAAAGTGGTGGTTGTTGGTACGGTTCCAACAAGGCTTGAAGCAAAAAGTATTG	1040
3' LTR	1038
5' LTR	TTGCGTTCTTAACCAACGAATGCTCTTGCTTATGAAATGCTTTATGCATCA	1091
3' LTR	1089

Abb. 3.15: Sequenzvergleich zwischen 5'-LTR und 3'-LTR von *Beetle1*

Gleiche Nukleotide der beiden LTR-Bereiche sind durch einen Punkt wiedergegeben. Deletionen sind durch einen Strich gekennzeichnet. Mögliche Positionen des Polyadenylierungssignals (A) und der Initiator (Inr)-Sequenz (B) sind in kursiver und fetter Schreibweise gekennzeichnet.

3.4.3 *Beetle1* ist in ein anderes Ty3-gypsy-Retrotransposon integriert

Die Endsequenz des BACs 2C11 am SP6-Ende enthielt neben dem 3'-Ende des 3'-LTRs von *Beetle1* weitere 274 bp, die stromabwärts des LTRs lagen. Datenbankrecherchen zeigten Homologien zur Protease-Region von Ty3-gypsy-Retrotransposons. Der Vergleich mit dem entsprechenden Sequenzbereich von *Beetle1* ergab eine Homologie von 48 %.

Wie in der Restriktionskarte des *Bam*HI-Fragments (Abb. 3.13) zu sehen, beinhaltete der 4724 bp lange Subklon BF-*Eco*RI-5 neben dem 5'-LTR und *gag-pol*-Bereichen von *Beetle1* Sequenzen, in die *Beetle1* integrierte. Dieser 1017 bp lange DNA-Abschnitt im 5'-Bereich des Subklons zeigte Homologien mit Bereichen aus der Protease und Reversen Transkriptase von Ty3-gypsy-Retrotransposons. Zum entsprechenden Sequenzabschnitt von *Beetle1* ergab sich

eine Homologie von 47,4 %. Dieser Wert war vergleichbar mit dem Wert, der für die Ty3-gypsy-Retrotransposon-Sequenz am SP6-Ende des BACs 2C11 berechnet wurde. Diese Ergebnisse lassen die Anwesenheit eines weiteren Ty3-gypsy-Retrotransposons auf dem BAC 125N12 vermuten. Erst durch die Analyse der dazugehörigen LTRs lassen sich diese Sequenzen aus dem *gag-pol*-Polyprotein von der *Beetle1*-Familie abgrenzen.

3.5 Identifizierung eines zweiten Ty3-gypsy-Retrotransposons

3.5.1 Isolation eines vollständigen *Beetle2*-Retrotransposons

Aus der Sequenzierung des *Bam*HI-Fragments und dessen Subklonen waren 1291 bp bekannt, die nicht zu *Beetle1* gehören. Die Basen CCATC vor dem 5'-LTR und nach dem 3'-LTR von *Beetle1* definierten eine fünf Basenpaar umfassende Zielsequenzverdopplung (TSD). Somit sollten sowohl die Sequenzen vor als auch nach *Beetle1* einem Ty3-gypsy-Retrotransposon zuzuordnen sein, das durch die Integration von *Beetle1* unterbrochen wurde.

Durch direkte Sequenzierung des BACs 125N12 (Abb. 3.16 B) konnte diese Retrotransposon-Sequenz in beide Richtungen auf insgesamt 4670 bp verlängert werden und führte zur Aufklärung eines fast vollständigen *gag-pol*-Polyproteins. Der 3'-Bereich der Integrase fehlte. Dieses weitere Ty3-gypsy-Retrotransposon wurde *Beetle2* benannt. Für die Sequenzierung der 5'- und 3'-LTRs von *Beetle2* musste ein anderes experimentelles Vorgehen gewählt werden, da das *Primer Walking* nur bei unikalenen Sequenzen funktioniert.

Die Endsequenzen der selektierten BACs (Tab. 3.1) dienten als Grundlage für die Suche nach *Beetle2*-Homologen. Der Vergleich der BAC-Endsequenzen mit dem *gag-pol*-Bereich von *Beetle2* ergab eine Übereinstimmung mit T7-Endsequenz des BACs 110G22. Mit einer Homologie von 94,4 % repräsentierte diese 605 bp lange Endsequenz einen Bereich aus der 5'-UTR einer anderen *Beetle2*-Kopie. Es konnte eine potentielle PBS durch die Homologie zur tRNA^{Met} identifiziert werden. Zwei Basen stromaufwärts der PBS gelegen konnte das Dinukleotid CA lokalisiert werden, welches das 3'-Ende des 5'-LTRs darstellt. Insgesamt umfasste der 3'-Bereich der Endsequenz die letzten fünf Basen des 5'-LTRs und ermöglichte die Entwicklung eines PBS-Primers, der für die *Beetle2*-Familie spezifisch ist.

Die Assemblierung von *Sau*3AI-Subklonen und der T7-Endsequenz des BACs 110G22 ergab ein Amplikon-Contig, das Bereiche aus dem 5'-LTR abdeckte. Das 5'-Ende des 5'-LTR konnte nicht auf diesem Weg identifiziert werden. Deshalb wurden Amplikons, die aus inverse PCR-Analysen mit *Afa*I- und *Taq*I-restringierten BACs der Klasse I (Tab. 3.1) stammten, mit in die Analyse der LTR-Sequenzen einbezogen. Aus den editierten Sequenzen

ging nicht im gesamten Bereich des 774 bp langen LTRs eine 100 %ige Homologie hervor. Zur Entwicklung der LTR-Primer konnten deshalb nur die in allen Sequenzen konservierten Bereiche genutzt werden. Durch die Kombination aus LTR-Primer und Primer des *gag-pol*-Polyproteins (Abb. 3.16 C) wurden 751 bp für den 5'-LTR und 771 bp für den 3'-LTR von *Beetle2* aus dem BAC 125N12 kloniert und sequenziert. Die fehlenden 23 Basenpaare am 5'-Ende des 5'-LTR und sieben Basenpaare am 3'-Ende des 3'-LTR mussten durch eine andere Methodik aufgeklärt werden. Die folgenden Versuchsansätze sollten der Ermittlung der fehlenden LTR-Sequenzen dienen.

Die Kenntnis über interne *Sau3AI*-Schnittorte in der LTR-Sequenz führte zur Idee nach der Subklonierung des BACs 125N12 mit *Sau3AI* die Subklone zu identifizieren, die die Randbereiche der LTR-Sequenzen beherbergen. Es wurden insgesamt zwei Subklon-Banken (ca. 400 Klone) erstellt aus denen nach Koloniehybridisierung, mit speziell auf den gesuchten Bereich abgestimmten LTR-Sonden, keine relevanten Klone selektiert werden konnten.

Die Interspersion von *Beetle1* mit dem Satellitenrepeat pTS5 führte zu der Idee, dass auch eine Integration von *Beetle2* in diesen Satelliten denkbar wäre. Deshalb erfolgten PCR-Ansätze, in denen Satelliten-Primer und *Beetle2*-Primer in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt wurden. Aus der Primerkombination So_*Beetle2*-LTR for und pTS5 for resultierte aus dem BAC 125N12 ein Amplikon. Die 774 bp lange Sequenz beinhaltete 653 bp eines am 3'-Ende vollständigen 3'-LTR der *Beetle2*-Familie. Dieser LTR-Bereich stimmte mit dem bereits klonierten Sequenzabschnitt des 3'-LTRs von *Beetle2* (*Beetle2_PPT* for/*Beetle2_LTR* rev; Abb. 3.16 C) zu 98,8 % überein. Die gefundenen Abweichungen ließen den Schluss zu, dass es sich um die Sequenz eines anderen *Beetle2*-LTR handelte.

Die Aufklärung eines vollständigen 5'-LTR sollte durch die lineare PCR mit dem in den 5'-Bereich gerichteten Primer *Beetle2_PBS* rev2 erfolgen. Es konnte ein 960 bp langes Amplikon kloniert werden, das die Sequenz eines vollständigen 5'-LTRs beinhalten sollte. Über 600 bp dieses Amplikons, vom 3'-Ende des 5'-LTRs bis zur Basenpaarposition 174, waren mit der in Abbildung 3.16 C dargestellten klonierten *Beetle2*-Sequenz (*Beetle2_PBS* rev2/*Beetle2_LTR* for) aus dem 5'-LTR zu 97,2 % homolog. Diese Divergenz resultierte vor allem aus der Deletion von neun Nukleotiden an Position 302-310. Die Homologie für die stromaufwärts gelegenen Sequenzbereiche nahm mit 49,7 % stark ab und der Beginn des LTRs konnte nicht identifiziert werden.

Alle bisherigen Versuche die LTR-Sequenzen von *Beetle2* zu komplettieren waren erfolglos. Zudem konnten keine Erkenntnisse über den Integrationsort von *Beetle2* gewonnen werden. Die gleiche Basenpaaranzahl im 5'- und 3'- LTR vorausgesetzt, lässt sich die theoretische Sequenz eines vollständigen *Beetle2*-Retrotransposons mit einer Gesamtlänge von 6690 bp angeben (Abb. A2, Anhang).

Die Abbildung 3.16 gibt einen Überblick über die aus dem BAC 125N12 klonierten DNA-Sequenzen von *Beetle1* und *Beetle2*. Dabei sind die unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen in einzelnen Teilabbildungen aufgeführt.

In der Abbildung 3.16 A sind die Sequenzen, die aus der Subklonierung des *Bam*HI-Fragments resultierten, maßstabsgetreu dargestellt. Weiterhin sind die *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen gezeigt, die durch PCR mit den Primern SP6 und *Beetle1*_PPT for aus dem BAC 2C11 amplifiziert wurden. Hierbei handelt es sich um den Vektor pBeloBAC11, in den das *Bam*HI-Fragment aus dem BAC 125N12 kloniert wurde, das nach der Southern-Analyse auf die Anwesenheit eines vollständigen *Beetle1*-Retrotransposons schließen ließ.

In der Teilabbildung 3.16 B sind die *Beetle2*-Sequenzen dargestellt, die sich aus dem *Primer Walking* ergaben. Sie dienten der Entwicklung von *Beetle2*-Primern, die im nächsten Schritt die Klonierung der Sequenzen ermöglichte.

Die Primer und die aus der PCR resultierenden Amplikons, die zur Klonierung eines fast vollständigen *Beetle2*-Retrotransposons führten, sind in Teilabbildung 3.16 C dargestellt.

Abb. 3.16: Strategie zur Klonierung von *Beetle1* und *Beetle2*

A) Maßstabsgetreue Darstellung des 13 401 bp langen Bereichs des BACs 125N12, der die Integration einer vollständigen *Beetle1*-Kopie in das *Beetle2*-Element einschließt. Das Schema zeigt die Größe und Anordnung der mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Eco*RI erstellten BAC-Subklone. Mit der gestrichelten Linie ist das mit der Primerkombination *Beetle1*_PPT for und SP6 erzeugte Amplikon aus dem BAC 2C11 dargestellt. Dieser BAC-Klon beinhaltet ein ca. 15kb großes *Bam*HI-Fragment aus dem BAC 125N12, welches in Southern-Analysen durch Hybridisierung mit allen *Beetle1*-Bereichen auf die Existenz eines vollständigen *Beetle1*-Elements rückschließen ließ. B) Lage der Sequenzierprimer (kursive Beschriftung, Start am Pfeilende mit Raute), die für das *Primer Walking* auf dem BAC 125N12 genutzt wurden. Die Pfeilspitze zeigt in 5'→3'-Richtung der erzeugten Sequenz; die Pfeillänge gibt die resultierende Sequenzlänge an. C) Darstellung der klonierten Sequenzbereiche zur Sicherung der Ergebnisse aus dem *Primer Walking* und zur Abdeckung der gesamten rekombinanten Struktur zwischen *Beetle1* und *Beetle2*.

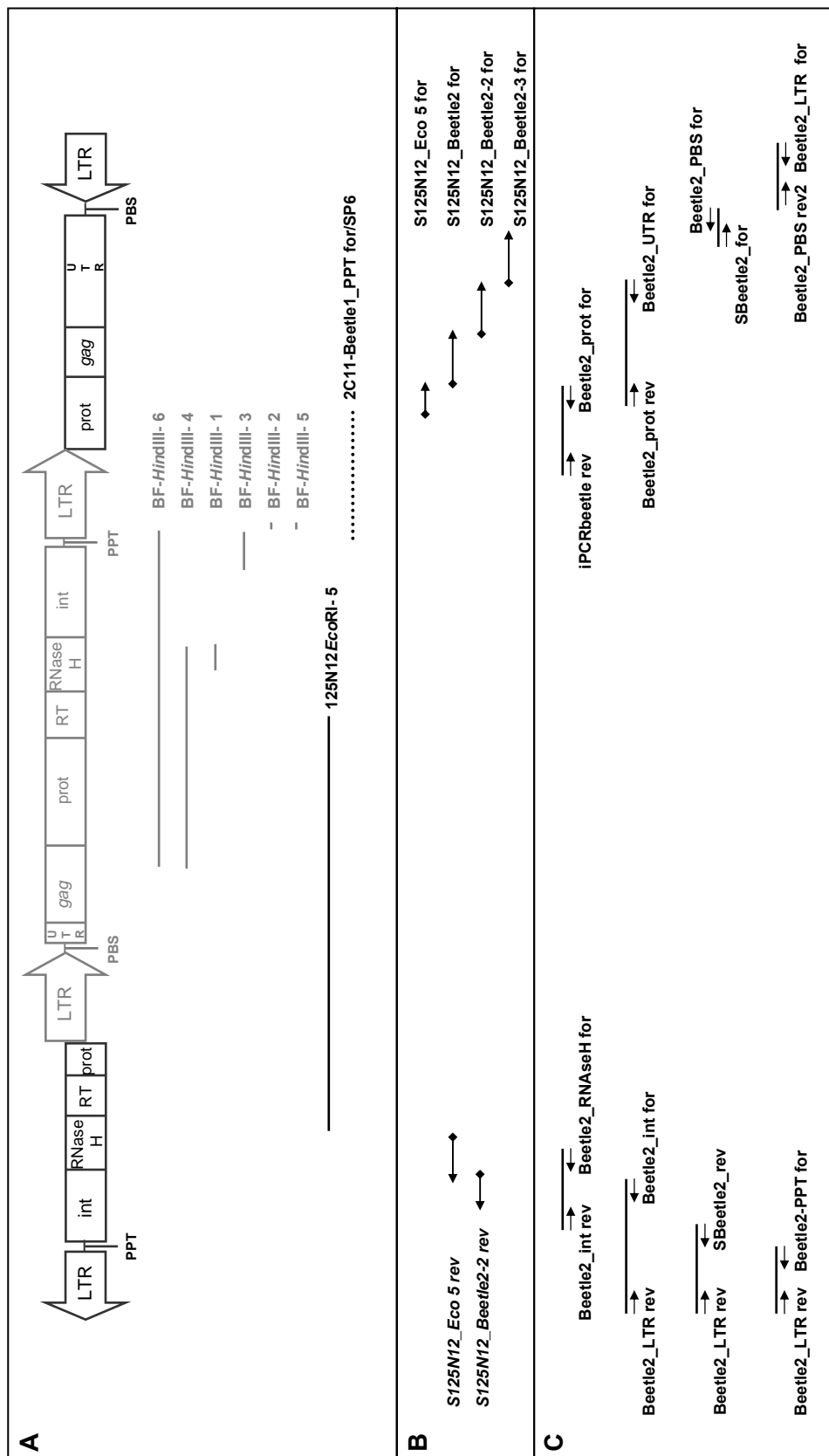


Abb. 3.16: Strategie zur Klonierung von *Beetle1* und *Beetle2*.

3.5.2 Molekulare Charakterisierung des LTR-Retrotransposons *Beetle2*

Das LTR-Retrotransposon *Beetle2* hat eine Gesamtlänge von 6690 bp und wird von LTR-Sequenzen begrenzt, die eine Länge von 774 bp aufweisen. Am Anfang und Ende der LTRs wurde das typische Dinukleotid 5'-TG...CA-3' gefunden, welches Bestandteil der sieben Basenpaar umfassenden invertierten Sequenzwiederholung 5'-TGA(C)ATG..CAT(A)TCA-3' ist. Dabei zeigte sich, dass innerhalb der Sequenzwiederholung die Position 4 nicht aus invertierten Basen besteht. Am 5'-Ende befindet sich an dieser Stelle ein Cytosin (in Klammern), woraus am 3'-Ende ein Guanin resultieren müsste. Hier wurde stattdessen ein Adenin (in Klammern) identifiziert.

Das *gag-pol*-Polyprotein umfasst einen ORF von 1305 Aminosäuren, der bis in den 3'-LTR reicht und sich durch mehrere Wechsel im Leseraster auszeichnet. Das Polyprotein ist durch ein Startcodon von einer 1359 bp langen stromaufwärts gelegenen untranslatierten Region (UTR) abgrenzbar. Stromabwärts vom 5'-LTR befindet sich die PBS, die wie bei *Beetle1* ebenfalls eine Homologie zur tRNA_i^{Met} aufweist. Die Homologie der PBS erstreckt sich über eine Region von 14 bp zum 3'-Ende dieser tRNA. Vor dem 3'-LTR befindet sich ein typischer Polypurinbereich (PPT), der mit den 14 Purinen 5'-GAAGAGGGGGAGAA-3' deutlich länger als die entsprechende Region in *Beetle1* ist. Die wesentlichen Daten von *Beetle2* sind in Abbildung 3.17 übersichtsartig dargestellt.

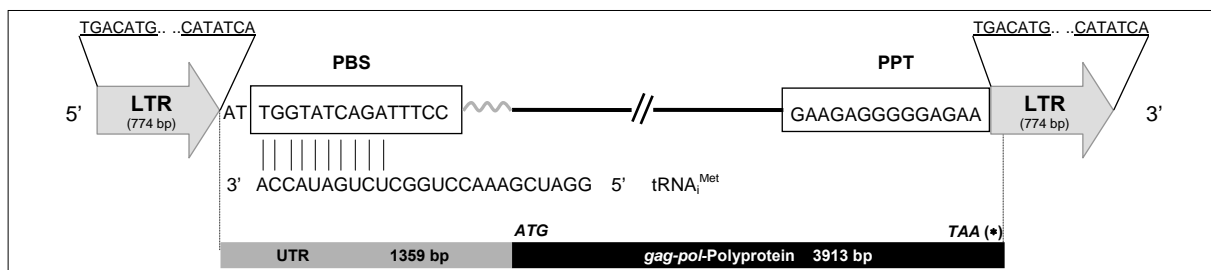


Abb. 3.17: Strukturelle Bereiche des Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle2*.

Die terminalen Pfeile an beiden Enden von *Beetle2* repräsentieren die begrenzenden LTRs. Oberhalb sind die sieben Basenpaar langen invertierten Sequenzwiederholungen innerhalb jedes LTRs dargestellt. Die Sequenzen für die Primerbindungsstelle (PBS) und den Polypurinbereich (PPT) sind eingerahmt. Die zehn übereinstimmenden komplementär zur PBS-Region vorliegenden Nukleotide des 3'-Endes der Initiator tRNA Methionin sind durch Verbindungslinien markiert. Die Position und Länge des *gag-pol*-Polyproteins (schwarzes Rechteck) und der vorgeschalteten untranslatierten Region (UTR; graues Rechteck) sind im unteren Abbildungsteil in farbig gefüllten Rahmen dargestellt. Das Startcodon ist durch ATG markiert, das Stoppcodon resultiert aus TAA (*).

Die Gesamtlänge der *Beetle2*-LTRs von 774 bp (Abb. 3.18) konnte durch Assemblierung der rechten und linken LTR-Sequenzen bestimmt werden. Die LTRs enthielten Basenpaar-substitutionen und waren im überlagerten Bereich 99,6 % homolog.

Ein TATA-Box-ähnliches Motiv TATAAAT (Pos. 431-437) und eine Initiator (Inr)-Sequenz TTCAGG (Pos. 540-545) wurden als wichtige Promotorkomponenten ermittelt. An Basenpaarposition 209-214 wurde das Polyadenylierungssignal 5'-AATTAAA-3' identifiziert.

5' LTR	-----CAACCATTGGAGATGAGCCTATTGCTTGGTTCTTGAGACCTTTGGATTCAAGCTCA	80
3' LTR	TGACATGAGTCTAGAGCCAAAGT.....	80
5' LTR	AGGCCAATGGATCTTTTGTGACTATGTTAGCTTGGGAAGAAGAACTAGCTTGAAATGGCTAATATGGGGCGTCCATAGCC	160
3' LTR	160
5' LTR	ATTTATAGAGTATTCTATTGCTTTTGTGTGAGTCATTTTATTTCATGTA AATAAA ACTACATTAGGATCGAAATTCGGTT	240
3' LTR	240
5' LTR	GGTTATGTAGATTCTTGTAGGTTCCAAATCCTATTGGGATTAGGATTGCGTGTGGAAAGTGATAAGGCCGAATGCCTATC	320
3' LTR	320
5' LTR	ATTTTCCTTAGGTGCTTATCCTTGCTTATCTTTCCCTTCATTTTAGGGATTAGTTTATCTTGCTTTTATAGATAGAATT	400
3' LTR	400
5' LTR	AGGGTTCCTTATCATACTAGAGTGTACTAG TATAAAT AAGGAGCTATGTACGCCATTTTTCATTCAGAATATGTTAAGAA	480
3' LTRA.....	480
5' LTR	CTTTGAGTCATTTTTCGAGCTTAATTGTTGTCAATTAAATTCGTGCCATTTAATAATTT TTCAGG AGTGATAATTATTGA	560
3' LTR	560
5' LTR	GTGATTAATCTACTTAATTCCAGGAGTGTTTAAAGTGAGATTGAAAGTTAATTAAATCTTTCAGGAGTGATTGATTAAAT	640
3' LTRC.....	640
5' LTR	TTCCATATCCCATAACACATAAAGATACAGACTTTAGCCACAAAAACACATAAAAAATTCGGACTTTTAAATATCTAGGTT	720
3' LTRA.....	720
5' LTR	CCTTTGCATTGGAGTACACTTGAATATCGCTTTTCATAGAGCCATATTCATATCA	774
3' LTR	-----	774

Abb. 3.18: Sequenzvergleich zwischen 5'-LTR und 3'-LTR von *Beetle2*

Die fehlenden 23 Basenpaare des 5'-LTR und sieben Basenpaare des 3'-LTR sind durch Striche dargestellt. Gleiche Nukleotide innerhalb der beiden LTR-Bereiche sind durch einen Punkt wiedergegeben. Mögliche Positionen des Polyadenylierungssignals (A), der TATA-Box (B1) und einer Initiator (Inr)-Sequenz (B2) sind in kursiver und fetter Schreibweise gekennzeichnet.

3.6 Das Alter von *Beetle1* und *Beetle2*

Aufgrund der LTR-Sequenzen von *Beetle1* und *Beetle2* war eine Berechnung des Alters für beide Kopien möglich. Die Datierung basiert auf der Bestimmung der Nukleotiddivergenz zwischen dem 5'- und 3'-LTR und geht dabei davon aus, dass zu dem Zeitpunkt der Integration die LTRs absolut identisch sind. Im Laufe der Zeit treten Mutationen auf, die im Wert ungefähr der Genomrate gleichzusetzen sind. Unter Verwendung der genomspezifischen synonymen Substitutionsrate, bei der der Austausch eines Nukleotids im Codon nicht zu einer Änderung in der kodierten Aminosäure führt, kann die Altersberechnung anhand der Formel $T=d/2k$ erfolgen. Das Alter (T) berechnet sich aus der genetischen Distanz $[1-(\text{Prozent Identität}/100)]$ geteilt durch 2x Substitutionsrate (k).

Für *Beta* ist keine synonyme Substitutionsrate veröffentlicht, so dass neben Substitutionsraten für die *Poaceae*-Familie (Vitte *et al.*, 2004; Ma & Bennetzen, 2004) auch Substitutionsraten aus den dikotylen Leguminosen (Pfeil *et al.*, 2005) und *Brassicaceae* (Koch *et al.*, 2000) für die Berechnung zugrunde gelegt wurden. Das aus der jeweiligen Substitutionsrate resultierende Alter für *Beetle1* und *Beetle2* ist in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3: Altersberechnung von *Beetle1* und *Beetle2* unter Verwendung verschiedener Substitutionsraten

Substitutionsrate	Alter in Jahren		Referenz
	<i>Beetle1</i>	<i>Beetle2</i>	
2×10^{-8}	92 000	97 000	Vitte <i>et al.</i> , 2004
$1,3 \times 10^{-8}$	140 000	150 000	Ma & Bennetzen, 2004
$1,5 \times 10^{-8}$	120 000	130 000	Koch <i>et al.</i> , 2000
$5,2 \times 10^{-9}$	350 000	375 000	Pfeil <i>et al.</i> , 2005

Das Alter der *Beetle1*- und *Beetle2*-Kopie variiert je nach verwendeter Substitutionsrate zwischen ungefähr 100 000 Jahren und 350 000 Jahren. Dabei ist *Beetle1* jünger als *Beetle2*, was in der Integration von *Beetle1* in *Beetle2* begründet liegt. Beide *Beetle*-Familien sind demnach sehr jung, jedoch müssen die Altersangaben durch die Untersuchung weiterer vollständiger *Beetle1*- bzw. *Beetle2*-Mitglieder gefestigt werden.

3.7 Transkription der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2*

3.7.1 Northern-Analysen

In Northern-Analysen wurde sowohl Gesamt-RNA als auch mRNA von *B. procumbens*, PRO1 und *B. vulgaris* untersucht. Die isolierte RNA wurde nach einer DNase-Behandlung auf Kontamination mit DNA-Rückständen überprüft. Diese Reinheitskontrolle erfolgte durch den Nachweis des gespleißten Genproduktes des Elongationsfaktors-1 alpha in der RNA. Die PCR mit spezifischen Primern wies in genomischer DNA ein 751 bp großes Amplikon nach. Ein um 113 bp kleineres Produkt war nach RT-PCR zu erwarten, da im Gegensatz zur genomischen Sequenz in der cDNA kein Intron mehr vorliegt. Die Sequenzierung der unterschiedlich großen PCR-Produkte (DNA/cDNA) zeigte die erwarteten Sequenzen des Elongationsfaktors und schloss Verunreinigungen der isolierten RNA mit DNA aus.

Northern-Analysen von mRNA und Gesamt-RNA zeigten nach Hybridisierung mit den *Beetle1*-spezifischen DNA-Sonden für den LTR, die *gag*-Region und die Reverse Transkriptase keine Signale (Abb. 3.19). Aus der Hybridisierung von Northern-Filtern mit der Reversen Transkriptase von *Beetle2* (o. Abb.) resultierten ebenfalls keine Hybridisierungs-

signale. Die als Kontrolle durchgeführte Hybridisierung mit einer DNA-Sonde für die 18S-rRNA dokumentierte mit Signalen im erwarteten Größenbereich eine ausreichende DNA-Qualität und -Quantität.

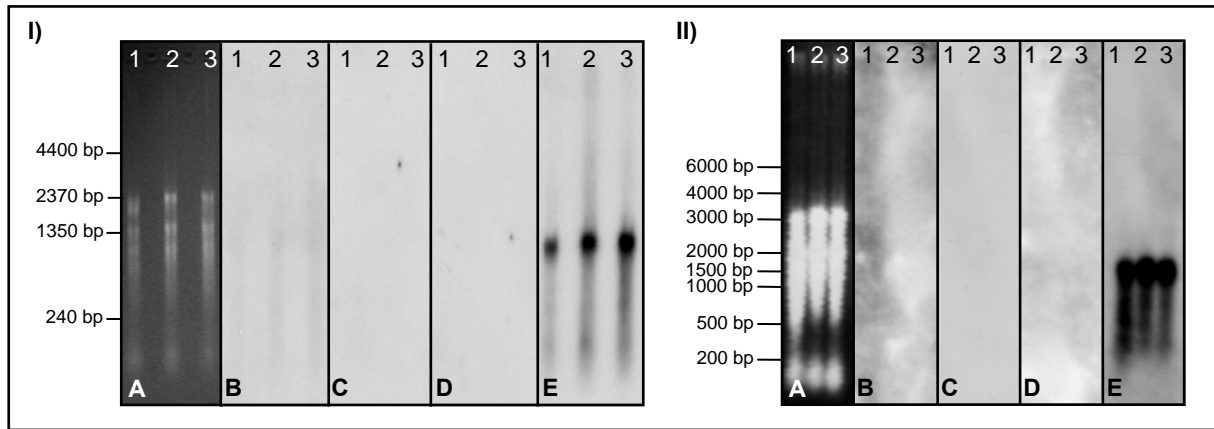


Abb. 3.19: Northern-Analysen mit mRNA und Gesamt-RNA verschiedener *Beta*-Arten mit spezifischen Sonden aus *Beetle1*.

A) Ethidiumbromid-gefärbtes formamidhaltiges Agarosegel mit mRNA (I) und Gesamt-RNA (II) aus *B. procumbens* (1), PRO1 (2) und *B. vulgaris* (3). B) Northern-Filter nach Hybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR, dem gag-Bereich (C) der Reversen Transkriptase-Sonde (D) und einer DNA-Sonde für die 18S-rRNA (E) zur Kontrolle der RNA in Qualität und Quantität.

3.7.2 Reverse Transkription und RT-PCR

Um die Transkription von *Beetle1* und *Beetle2* nachzuweisen, wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und in einer PCR zur Amplifikation spezifischer Sequenzen verwendet. Für die reverse Transkription wurde RNA von *B. procumbens* und *B. vulgaris* eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer *Beetle1*- und *Beetle2*-Primer für LTR, UTR und Bereiche des *gag-pol*-Polyproteins (*gag*, Protease, Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase) erfolgten PCR-Amplifikationen (Abb. 3.20).

In den für *Beetle1* spezifischen PCR-Ansätzen (Abb. 3.20; Spuren 1-14) wurden die PCR-Produkte nur in der cDNA von *B. procumbens* (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13) detektiert. Sie entsprachen den erwarteten Produktgrößen (Material und Methoden, Tab. 2.10). Lediglich der Ansatz mit RNaseH-Primern (Spur 9) zeigte zusätzlich ein schwächeres PCR-Produkt oberhalb der erwarteten Größe, dessen Herkunft nicht untersucht wurde.

In den PCR-Ansätzen mit *Beetle2* spezifischen Primern (Abb. 3.20; Spuren 15-26) wurden die Amplikons ausschließlich in cDNA von *B. procumbens* (Spuren 17, 19, 21, 23, 25) identifiziert. Aus der PCR mit den *Beetle2*-Primern für die UTR (Spur 15) resultierte kein Amplikon. In allen PCR-Ansätzen mit cDNA aus *B. vulgaris* wurden keine Sequenzen aus *Beetle1* und *Beetle2* amplifiziert.

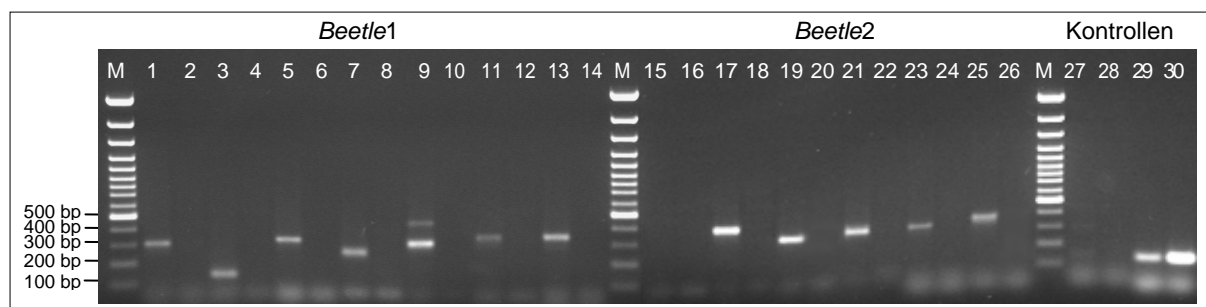


Abb. 3.20: Amplikons aus der PCR mit cDNA aus *B. procumbens* und *B. vulgaris* unter Verwendung von *Beetle1*- und *Beetle2*- spezifischen Primern.

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit Amplikons aus den *Beetle1*-Bereichen für: UTR (1, 2), *gag* (3, 4), Protease (5, 6), Reverse Transkriptase (7, 8), RNaseH (9, 10), Integrase (11, 12) und LTR (13, 14); aus den *Beetle2*-Bereichen für: UTR (15, 16), Protease (17, 18), Reverse Transkriptase (19, 20), RNaseH (21, 22), Integrase (23, 24) und LTR (25, 26). Als Kontrollen wurden PCR-Reaktionen mit Primern für den Satelliten pTS5 (27, 28) und einen Bereich aus der 5S-rRNA (29, 30) durchgeführt. Die Amplikons aus cDNA von *B. procumbens* befinden sich in den Spuren mit ungeraden Zahlen, für *B. vulgaris* in den geraden Spuren.

In den PCR-Ansätzen mit *Beetle2* spezifischen Primern (Abb.3.20; Spuren 15-26) wurden die Amplikons ausschließlich in cDNA von *B. procumbens* (Spuren 17, 19, 21, 23, 25) identifiziert. Aus der PCR mit den *Beetle2*-Primern für die UTR (Spur 15) resultierte kein Amplikon. In allen PCR-Ansätzen mit cDNA aus *B. vulgaris* wurden keine Sequenzen aus *Beetle1* und *Beetle2* amplifiziert.

Nach der Klonierung der PCR-Produkte wurden in der Sequenzanalyse zwei rekombinante Plasmidklone (RT-Klone) je DNA-Bereich sequenziert. Die RT-Klone mit *Beetle1*-Sequenzen waren identisch. Im Vergleich mit der DNA-Sequenz des vollständigen *Beetle1*-Elements aus dem BAC 125N12 waren bis auf den UTR-Bereich Sequenzabweichungen festzustellen. In der folgenden Abbildung 3.21 werden diese Unterschiede exemplarisch für die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz aus der Region der Reversen Transkriptase gezeigt.

<i>Beetle1</i> -RVT	GATGAATGGAACAGCCTTTAAGACTAAGAGTGGGTTATATGAGTGGCGT-----GTTATGCCATTTGGTTTAACTAATGCTCCTAGT	84
RT-KloneA·AACTAT.....C	90
<i>Beetle1</i> -RVT	ACTTTCATGAGGCTCATGCATGAGGTACTTCGTCCTTTCATTGGTTCTGTTGTTGGTTTATTTTGATGATATTCTTGTTATAGCAAC	174
RT-KloneT.....C.....C.....A.....A...	180
<i>Beetle1</i> -RVT	AGTGAACAGGATCATCTTATTCATCTGAAGAAGGTTTTCCTTAAGCTAAGGGAAGAAGCTATATGCAAAGATGGAGAAGTGT	258
RT-Klone	·A·.....G.....	264
<i>Beetle1</i> -RVT	DEWKTAFKTKSGLYEW--VMPFGLTNAPSTFMRLMHEVLRPFIGSFVVVYFDDILVYSNSEQDHLIHLKKVFLKLEKKLYAKMEKC	3701
RT-KloneHNY.....R·N.....V.....	264

Abb. 3.21: Homologievergleich zwischen der Reverse Transkriptase-Region von *Beetle1* und der entsprechenden Sequenz aus der RT-PCR mit cDNA von *B. procumbens*

Im oberen Teil der Abbildung ist der Vergleich zwischen den DNA-Sequenzen dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt den Vergleich zwischen den daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Homologe Basen bzw. Aminosäuren sind durch einen Punkt wiedergegeben. Die Länge der Sequenzen (oben) bzw. der entsprechende Abschnitt aus *Beetle1* (unten) ist in Basenpaaren angegeben. Lücken in der Sequenz sind durch einen Strich dargestellt.

Die Homologien zwischen den Sequenzen aus der RT-PCR und den *Beetle1*-Sequenzen aus dem BAC 125N12 (Tab. 3.3) lagen je nach untersuchter Region zwischen 90,3 % (Protease) und 97,4 % (Integrase). Innerhalb des 346 bp langen Sequenzabschnittes aus dem *Beetle1*-LTR wurde eine Divergenz von 3,8 % berechnet. Die Position der amplifizierten DNA-Abschnitte in Bezug auf *Beetle1* aus dem BAC 125N12 ist in Klammern angegeben.

Tab. 3.4: Homologievergleich von PCR-Produkten aus cDNA von *B. procumbens* mit genomischen Sequenzen aus *Beetle1*

Sequenzbereich	Klonbezeichnung	Homologie zur genomischen Sequenz von <i>Beetle1</i>
LTR (297-642 bp)	<i>Beetle1</i> LTR RT-Klone	96,2 %
UTR (1118-1256 bp)	<i>Beetle1</i> UTR RT-Klone	100 %
<i>gag</i> (1340-1648 bp)	<i>Beetle1 gag</i> RT-Klone	96,1 %
Protease (2400-2740 bp)	<i>Beetle1</i> prot RT-Klone	90,3 %
Reverse Transkriptase (3447-4178 bp)	<i>Beetle1</i> RVT RT-Klone	93,2 %
RNaseH (3863-4178 bp)	<i>Beetle1</i> RNase RT-Klone	96,2 %
Integrase (4552-4899 bp)	<i>Beetle1</i> int RT-Klone	97,4 %

Die RT-Klone der *Beetle2*-Sequenzen wiesen bis auf den LTR-Bereich ebenfalls Unterschiede in ihrer Basenabfolge auf. Im Vergleich mit der genomischen Sequenz der *Beetle2*-Kopie vom BAC 125N12 ließen sich die in Tab. 3.4 zusammengefassten Homologien feststellen. Die Position der amplifizierten DNA-Abschnitte in Bezug auf *Beetle2* aus dem BAC 125N12 ist in Klammern angegeben.

Tab. 3.5: Homologievergleich von PCR-Produkten aus cDNA von *B. procumbens* mit genomischen Sequenzen aus *Beetle2*

Sequenzbereich	Klonbezeichnung	Homologie zur genomischen Sequenz von <i>Beetle2</i>
LTR (122-457 bp)	<i>Beetle2</i> LTR RT-Klon 1 <i>Beetle2</i> LTR RT-Klon 2	100 % 100 %
Protease (2682-3050 bp)	<i>Beetle2</i> prot RT-Klon 1 <i>Beetle2</i> prot RT-Klon 2	81,1 % 95,9 %
Reverse Transkriptase (3767-4060 bp)	<i>Beetle2</i> RVT RT-Klon 1 <i>Beetle2</i> RVT RT-Klon 2	88,5 % 95,9 %
RNaseH (3863-4178 bp)	<i>Beetle2</i> RNase RT-Klone	96,2 %
Integrase (4760-5088 bp)	<i>Beetle2</i> int RT-Klone	95,4 %

Die Divergenz zu *Beetle2* lag je nach untersuchter Region zwischen 18,9 % (Protease) und 3,8 % (RNaseH). Auch innerhalb der RT-Klone aus einem Sequenzbereich waren Homologieunterschiede erkennbar. Der 335 bp lange Sequenzabschnitt aus dem *Beetle2*-LTR zeigte in den RT-Klonen keine Sequenzabweichung. Zur entsprechenden *Beetle2*-Sequenz wurde eine Homologie von 100 % ermittelt.

Es wurden bei den Analysen der cDNA aus *B. procumbens* *Beetle1*- und *Beetle2*- Transkripte gefunden, die teilweise untereinander und zur genomischen Sequenz der Ty3-gypsy-Retrotransposons identisch sind. Da nicht alle Transkripte den Sequenzen der genomischen Kopien aus dem BAC 125N12 zuzuordnen sind, ist die Transkription anderer Kopien wahrscheinlich.

3.8 Charakterisierung struktureller und funktioneller Bereiche von *Beetle1* und *Beetle2*

3.8.1 Vergleich der für die Reverse Transkription von LTR-Retrotransposons benötigten Primerbindungsstellen

Die Reverse Transkription von LTR-Retrotransposons wird durch die Anlagerung einer zellulären tRNA an die komplementäre Region der mRNA (PBS) initiiert. Als weitere Bindestelle für die Synthese des Zweitstrangs dient eine purinreiche Region (PPT).

Die für *Beetle1* und *Beetle2* stromabwärts des 5'-LTR und stromaufwärts des 3'-LTR ermittelten Primerbindungsstellen wurden mit den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus Mais, CRR aus Reis und *cereba* aus Gerste aus der Familie der *Poaceae* verglichen (Abb. 3.22).

			PBS			PPT		
<i>Beetle1</i>	CA	TT	TGGTA	TCAGAGCTTT	AACC	AGGGGAGAA	TG
<i>Beetle2</i>	CA	AT	TGGTA	TCAGA--TTT	AAGA	AGGGGAGAA	TG
CRM	CA	GT	TGGTAAT	TCAGAGCAAG	AAGA	AGGGGAGAA	TG
CRR	CA	AG	TGGTA	TCAGAGCTCA	AAGA	AGGGGAGGA	TG
<i>cereba</i>	CA	AG	TGGTA	TCAGA--TTT	AAGA	AGGGGAGGA	TG
tRNA ^{Met}		3'	ACCAU-AGUCUCGAAA				5'	

Abb. 3.22: DNA-Sequenzen einzelner Ty3-gypsy-Retrotransposons weisen potentielle Primerbindungsstellen für die Reverse Transkription auf

Dargestellt sind die charakteristischen Dinukleotide CA····TG zur Abgrenzung der LTR-Sequenzen. Die stromabwärts vom 5'-LTR gelegene PBS der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* (AJ539424) und *Beetle2* aus *B. procumbens*, CRM aus *Zea mays* (AY129008), CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; AB033234-35) und *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AY040832-33) ist komplementär zum 3'-Ende der Initiator-tRNA für Methionin aus *Arabidopsis thaliana*. Die PBS ist neben dem stromaufwärts des 3'-LTRs gelegenen PPT innerhalb der verglichenen LTR-Retrotransposons konserviert. Konservierte Bereiche sind schwarz unterlegt.

Durch zwei Basenpaare vom 5'-LTR separiert folgt bei den analysierten Ty3-gypsy-Retrotransposons die Primerbindungsstelle (PBS). Alle untersuchten Sequenzen zeigen Homologien zum komplementären 3'-Ende der Initiator-tRNA für Methionin. Dabei bilden mindestens 12 komplementäre Basenpaare die Bindungsstelle für die tRNA. *Beetle1* weist mit 15 Übereinstimmungen zum komplementären 3'-Ende der tRNA innerhalb der verglichenen LTR-Retrotransposons die längste PBS auf. *Beetle2* zeigt durch das nachträgliche Einfügen von Sequenzlücken einen übereinstimmenden Bereich von 13 Basen, der identisch mit der PBS von *cereba* ist.

Ähnlich gestaltet sich die Auswertung der purinreichen Sequenz, die vor dem 3'-LTR liegt. Der Polypurintrakt (PPT) ist in den fünf Ty3-gypsy-Retrotransposons stark konserviert. Bis auf *Beetle1* weisen alle Retrotransposons eine Region von 13 Purinbasen auf. In *Beetle1* wird dieser Bereich durch zwei Pyrimidinbasen unterbrochen.

3.8.2 Vergleich funktioneller Aminosäure-Motive im *gag-pol*-Polyprotein von *Beetle1* und *Beetle2*

Die Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* besitzen einen einzelnen offenen Leserahmen, welcher alle für die Transposition notwendigen Proteine kodiert. Der ORF codiert für ein *gag*-Strukturprotein, eine Protease, eine Reverse Transkriptase, eine RNaseH und eine Integrase.

Die einzelnen Proteine innerhalb des *gag-pol*-Polyproteins verfügen über charakteristische Aminosäuremotive, die neben einer Zuordnung zum entsprechenden Proteinbereich auch die Klassifizierung innerhalb der LTR-Retrotransposons ermöglichen. Die Reihenfolge der Gene ist kennzeichnend für Vertreter der Ty3-gypsy-Retrotransposons (*Metaviridae*).

Nachfolgend werden die einzelnen Kodierungsregionen innerhalb des *gag-pol*-Polyproteins (*gag*, Protease, Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase) von *Beetle1* und *Beetle2* mit weiteren Ty3-gypsy-Retrotransposons verglichen. Dafür wurden pflanzliche Retrotransposons ausgewählt, deren Struktur vollständig aufgeklärt ist. Die LTR-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350; Zhong *et al.*, 2002), CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466; Kumekawa *et al.*, 2001) und *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94518; Hudakova *et al.*, 2001) sind Vertreter centromerischer LTR-Retrotransposons (*Centromeric Retrotransposons*, CRs) die in der Familie der Süßgräser stark konserviert sind. Aus dem Vergleich mit *Beetle1* und *Beetle2* sollten sich konservierte Regionen centromerischer LTR-Retrotransposons abzeichnen.

Das Retrotransposon *del1-46* aus *Lilium henryi* (1510387A; Smyth *et al.*, 1989) wurde als nicht-centromerisches Ty3-gypsy-Retrotransposon mit in die Analysen einbezogen, um mögliche Unterschiede zwischen centromerischen und nicht-centromerischen LTR-Retrotransposons herauszustellen.

Das *gag*-Gen kodiert für ein Strukturprotein, das für den Aufbau der VLPs benötigt wird. Die Sequenz des *gag*-Proteins weist als konserviertes RNA-Bindemotiv das Aminosäuremuster CX₂CX₄HX₄C auf. Ein solches Bindemotiv, welches zur Ausbildung eines Zink-Fingers (Zn²⁺-Finger) befähigt, wurde auch in *Beetle1* und *Beetle2* identifiziert (Abb. 3.23).

<i>Beetle1</i>	C	F	K	C	H	G	Y	G	H	Y	Q	A	Q	C
<i>Beetle2</i>	C	F	K	C	Q	G	R	G	H	I	A	A	N	C
CRM	C	Y	R	C	K	G	Y	G	H	V	Q	R	D	C
CRR	C	L	R	C	K	G	Y	G	H	V	R	K	D	C
<i>cereba</i>	C	R	R	C	K	G	G	G	H	Y	A	R	E	C
<i>del1-46</i>	C	Y	S	C	G	Q	P	G	H	F	K	A	N	C

Abb. 3.23: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus dem *gag*-Bereich von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Das konservierte Motiv des *gag*-Bereiches CX₂CX₄HX₄C ist von AS 317 bis 332 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* (AJ539424) und von AS 134 bis 149 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350; Zhong *et al.*, 2002) CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466; Kumekawa *et al.*, 2001), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517; Hudakova *et al.*, 2001) und *del1-46* aus *Lilium henryi* (1510387A, Smyth *et al.*, 1989) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt.

Die zwischen dem Aminosäuremotiv des Zinkfingers gelegenen Aminosäuren sind innerhalb der LTR-Retrotransposons weniger stark konserviert. Dennoch ist auffällig, dass die centromerischen Retrotransposons aus Getreide über die betrachtete Region eine höhere Homologie zueinander aufweisen. *Beetle1* und *Beetle2* lassen sich zum überwiegenden Teil den centromerischen Retrotransposons zuordnen. Dennoch gibt es Regionen in denen eine Übereinstimmung zu *del1-46* und nicht zu den CRs vorliegt (Position 12). Weiterhin zeigen *Beetle1* und *Beetle2* auch Aminosäuren (Position 2 und 3) die nur in den *Beetle*-Retrotransposons vorkommen.

Die Protease spaltet das *gag-pol*-Polyprotein in funktionelle Proteine. Ein Aminosäuremotiv für das aktive Zentrum einer Aspartylprotease (DG/SGS) wurde in *Beetle1* und *Beetle2* detektiert. Der Vergleich der konservierten Domäne mit entsprechenden Motiven der anderen pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons wird in Abbildung 3.24 gezeigt.

<i>Beetle1</i>	M	I	I	D	G	G	S	C	T
<i>Beetle2</i>	V	I	I	D	S	G	S	C	T
CRM	L	I	I	D	G	G	S	C	N
CRR	V	I	I	D	G	G	S	C	N
<i>cereba</i>	V	I	I	D	G	G	S	C	N
<i>del1-46</i>	V	L	I	D	T	G	S	T	H

Abb. 3.24: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der Protease-Region von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Das konservierte Motiv der Protease-Region ID_XGS ist von AS 417 bis 425 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* (AJ539424) und von AS 232 bis 240 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350, CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *del1-46* aus *Lilium henryi* (1510387A) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt.

Die Abbildung zeigt, dass mit Ausnahme von *Beetle2* das aktive Zentrum als IDGG-S-Motiv in den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons konserviert ist. *Beetle2* besitzt mit IDSGS eine Variation des Aminosäure-Motivs, die sich gleichfalls vom IDTGS-Motiv in *del1-46* unterscheidet. Werden die an das aktive Zentrum angrenzenden Aminosäuren betrachtet, lassen sich *Beetle1* und *Beetle2* deutlich den Retrotransposons CRM, CRR und *cereba* zuordnen.

Ein in allen Retroelementen vorhandener Aminosäurebereich kodiert für die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die Reverse Transkription von RNA in DNA katalysiert. Innerhalb der Reversen Transkriptase konnten sieben Peptidomänen identifiziert werden (Xiong & Eickbush, 1990), die innerhalb der Retroelemente konserviert vorliegen. Beim Vergleich von *Beetle1* und *Beetle2* mit weiteren Ty3-gypsy-Retrotransposons aus Pflanzen wurden diese Domänen charakterisiert und konservierte Bereiche in Abbildung 3.25 dargestellt.

	I			II			III			IV			V						VI			VII	
<i>Beetle1</i>	PKKD	3	RM	CVD	52	KTAF	10	VMPFGL	21	FV	VV	YF	DD	IL	VYS	27	KCE	F	6	FLG			
<i>Beetle2</i>	PKKD	3	RI	CID	52	KTAF	10	VMPFGL	21	F	I	VV	YL	DD	IL	VYS	27	KCD	F	6	FLG		
CRM	PKKD	3	RM	CVD	52	KTAF	10	VMPFGL	21	FV	VV	YF	DD	IL	IYS	27	KCT	F	6	FLG			
CRR	PKKD	3	RM	CVD	52	KTAF	10	VMPFGL	21	FV	VV	YF	DD	IL	IYS	27	KCT	F	6	FLG			
<i>cereba</i>	PKKD	3	RM	CVD	52	KTAF	10	VMPFGL	21	FV	VV	YF	DD	IL	IYS	27	KCT	F	6	FLG			
<i>del1-46</i>	PKKD	3	RM	CID	49	KTAF	10	VMPFGL	21	F	I	VV	FV	DD	V	IYS	27	KCE	F	6	FLG		

Abb. 3.25: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der Region der Reversen Transkriptase von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Die Motive der sieben konservierten Domänen der Reversen Transkriptase (Xiong & Eickbush, 1990) sind von AS 664 bis 840 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* (AJ539424) und von AS 473 bis 629 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Die Zahlen innerhalb des Alignments repräsentieren den Abstand zwischen konservierten Aminosäuremotiven. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350, CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *del1-46* aus *Lilium henryi* (1510387A) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt.

Dabei zeigte sich, dass die Abstände zu den einzelnen Peptidomänen in den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons gleich sind. Lediglich *dell-46* zeigt zwischen den Motiven II und III mit 49 dazwischen liegenden Aminosäuren einen kürzeren Abstand. *Beetle2* zeigte geringere Übereinstimmungen zu den CR-Elementen als *Beetle1*. In zwei Fällen wurden stattdessen homologe Aminosäuren mit *dell-46* festgestellt.

Die RNaseH erkennt das aus der Minusstrang-Synthese der cDNA entstandene RNA-DNA-Hybrid und baut den mRNA-Strang ab. Das konservierte T/CDAS-Motiv der RNaseH wurde in beiden *Beetle*-Elementen lokalisiert (Abb. 3.26).

<i>Beetle1</i>	C	D	A	S	G	V	G	I	G	A	V	L
<i>Beetle2</i>	C	D	A	S	G	I	G	I	G	A	V	L
CRM	C	D	A	S	G	I	G	L	G	G	V	L
CRR	C	D	A	S	G	I	G	L	G	G	V	L
<i>cereba</i>	C	D	A	S	G	I	G	L	G	G	V	L
<i>dell-46</i>	T	D	A	S	L	A	G	L	E	G	V	L

Abb. 3.26: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der RNaseH-Region von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Das konservierte Motiv der RNaseH ist von AS 919 bis 931 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* (AJ539424) und von AS 727 bis 739 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350, CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *dell-46* aus *Lilium henryi* (1510387A) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt.

Als klarer Unterschied zwischen den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons und dem nicht-centromerischen Vertreter *dell-46* konnte das Aminosäure-Motiv CDAS herausgestellt werden. Das Retrotransposons *dell-46* wies stattdessen die Abfolge TDAS auf. Die darauffolgenden acht Aminosäuren waren innerhalb der centromerischen Retroelemente stärker konserviert. Dabei zeigte sich, wie bereits in den anderen verglichenen Bereichen des *gag-pol*-Polyproteins, dass es Regionen gibt die in dieser Konstellation nur in den *Beetle*-Elementen vorkommen. Dafür stehen die drei Aminosäuren IGA, die den eigenständigen Charakter einzelner Bereiche unterstreichen.

Das Integrase-Protein ist durch Sequenzen im 3'-Bereich des *gag-pol*-Polyproteins kodiert. Kennzeichnend ist neben dem Zink-Finger-Motiv HHCC ein stromabwärts gelegenes DD35E-Motiv. In *Beetle1*, *Beetle2* und den weiteren untersuchten pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons wurde im Zink-Finger-Motiv die in Abbildung 3.27 dargestellte Abfolge HX₆HX₂₉CX₂C vorgefunden. Die Aminosäuren zwischen der charakteristischen Histidin- und Cystein-Abfolge des Zink-Fingers sind in den centromerischen LTR-Retrotransposons konserviert, jedoch weist *Beetle2* im Vergleich mit *Beetle1* weniger Übereinstimmungen auf.

<i>Beetle1</i>	HGGGLAGH	29	CSTC
<i>Beetle2</i>	HSGGVAGH	29	CASC
CRM	HGGGLMGH	29	CTTC
CRR	HGGGLMGH	29	CTTC
<i>cereba</i>	HGGGLMGH	29	CTTC
<i>del1-46</i>	HRSKFTIH	29	CLIC

Abb. 3.27: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus dem Zink-Finger-Motiv der Integrase-Region von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Das konservierte Motiv des Zink-Fingers ist von AS 1101 bis 1142 des *gag-pol*-Polypoteins von *Beetle1* (AJ539424) und von AS 905 bis 946 des *gag-pol*-Polypoteins von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350, CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *dell-46* aus *Lilium henryi* (1510387A) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt. Die Zahlen zwischen den einzelnen Motiven geben die Abstände zwischen den Aminosäuren an.

Die für das DD35E-Motiv charakteristischen Aminosäuren wurden innerhalb einer Region von 56 Aminosäuren detektiert und in Abbildung 3.28 graphisch dargestellt. Die Abstände zwischen den charakteristischen Aminosäuren innerhalb dieser beiden Motive können variieren. Bis auf *Beetle1* und *Beetle2*, die einen Abstand von 69 Aminosäuren aufweisen sind die anderen untersuchten Ty3-gypsy-Retrotransposons mit 70 dazwischen liegenden Aminosäuren gekennzeichnet. In der Aminosäuresequenz von *dell-46* konnte die erste Asparaginsäure (D) des DD35E-Motivs nicht an gleicher Position wie bei den restlichen analysierten Ty3-gypsy-Retrotransposons gefunden werden. Die Asparaginsäure wurde drei Aminosäuren stromaufwärts identifiziert. Bei der Betrachtung der zentralen Integrase-Region ist deutlich eine Gruppierung von *Beetle1* und *Beetle2* zu den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons erkennbar. Am 3'-Ende der untersuchten Region war ein hochkonservierter Bereich mit der Aminosäure-Abfolge HPQTDG in allen zum Vergleich herangezogenen Ty3-gypsy-Retrotransposons aufzufinden.

↓ ↓ ↓

Beetle1 DLYFKEIIRLHGVPKTIIVSDKDVKFLSFFWKTLWKL LGTKLLFSTTAHPQTDGQTE
Beetle2 DLYFREIIRLHGIPRSIVSDRDSKFLSHFWRS LWEMV GTKLLFSTSHHPQTDGQTE
CRM DLFREIIVRLHGVPNTIVSDRDAKFLSHFWRTLWAKL GTKLLFSTTCHPQTDGQTE
CRR DLFREIIVRLHGVPNTIVSDRDTKFLSHFWRTLWAKL GTKLLFSTTCHPQTDGQTE
cereba DLFREIIRLHGVPNTIVSDRDAKFLSHFWRCLWAKL GTKLLFSTTCHPQTDGQTE
del1-46 -LYIKEIIRLHGIPPTIVTDRDTKFTSRFWGS-LKSLGTELF FSTAFHPQTDGS-E

Abb. 3.28: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus dem DD35E-Motiv der Integrase von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Das konservierte DD35E-Motiv (Pfeile) der Integrase ist von AS 1230 bis 1267 des *gag-pol*-Polypeptids von *Beetle1* (AJ539424) und von AS 1034 bis 1071 des *gag-pol*-Polypeptids von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Zusätzlich ist der konservierte Aminosäureabschnitt HPQTDG integriert. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350, CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *dell-46* aus *Lilium henryi* (1510387A) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt.

Als drittes ausgeprägtes Motiv konnte im 3'-Bereich der Integrase-Region von *Beetle1* und *Beetle2* das GPY/F-Modul (Abb. 3.29) identifiziert werden. Dieses Motiv war in den untersuchten Ty3-gypsy-Retrotransposons vorhanden, weist jedoch keine universelle Ausbreitung in den *Metaviridae* auf (Malik & Eickbush, 1999).

<i>Beetle1</i>	K	N	K	L	M	P	R	S	D	G	P	F
<i>Beetle2</i>	K	N	K	L	M	P	R	A	D	G	P	F
CRM	K	S	K	L	L	P	R	A	D	G	P	F
CRR	K	S	K	L	L	P	R	A	D	G	P	F
<i>cereba</i>	K	S	K	L	M	P	R	A	G	G	P	F
<i>del1-46</i>	K	G	K	L	S	P	R	Y	T	G	P	F

Abb. 3.29: Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der zentralen Core-Region der Integrase von pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Das konservierte GPF-Modul ist von AS 1396 bis 1408 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* (AJ539424) und an von AS 1199 bis 1211 des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle2* aus *B. procumbens* lokalisiert. Vollständig konservierte Aminosäuren mit den Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (AAM94350, CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *del1-46* aus *Lilium henryi* (1510387A) sind schwarz unterlegt. Eine Übereinstimmung von mindestens 50 % ist grau unterlegt.

Aus den Untersuchungen der funktionellen Aminosäure-Motive der *gag-pol*-Polyproteine geht hervor, dass in den Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* diese Bereiche stark konserviert sind. Dabei konnten einerseits Aminosäuren ermittelt werden, die in allen untersuchten Ty3-gypsy-Retrotransposons fixiert sind. Andererseits zeichneten sich deutliche Unterschiede zwischen centromerischen und nicht-centromerischen LTR-Retrotransposons ab. Bis auf wenige Abweichungen lassen sich *Beetle1* und *Beetle2* durch ihre funktionellen Aminosäure-Motiven den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons aus der Familie der Süßgräser zuordnen. Die teilweise starken Abweichungen zu dem nicht-centromerischen *del1-46*, besonders im Bereich der Integrase, verdeutlichen die Einordnung von *Beetle1* und *Beetle2* in die Gruppe der centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons.

Detaillierte Untersuchungen der Integrase-Region von Chromoviren, einer Gruppe der *Metaviridae* die eine Chromodomäne besitzen, zeigten die Aufteilung in einzelne Stämme (Gorinšek *et al.* 2004). Basierend auf dieser Charakterisierung erfolgte in der Abbildung 3.30 der Vergleich zwischen den vollständigen Integrase-Regionen von *Beetle1* und *Beetle2* mit den Regionen aus den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM, CRR und *cereba*.

Abb. 3.30: Sequenzvergleich zwischen Chromointegrasen verschiedener LTR-Retrotransposons

Das Alignment der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen wurde mit ClustalW erstellt. Die Farbgebung erfolgte mit BioEdit (Hall, 1999), dafür wurde eine Homologie von mind. 50 % zugrunde gelegt. Aminosäuren mit der gleichen Aminosäurerest-Gruppe sind in gleicher Farbe unterlegt. Identische Aminosäuren sind schwarz umrandet.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Beta_Beetle1	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Beta_Beetle2	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Lotus_AP004525	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Medicago_AC131249	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Arabidopsis_AL161506	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Zea_CRM	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Oryza_CRR	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Hordeum_cereba	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Zea_Reina	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Musa_monkey	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
Takifugu_Sushi	ADALSRPHSL	LMARVLC	FTTHKRLV	YDQDPS	PLTACRDS	HGANSWLD	EPLFNN	KLCILKCS	LPLLLKE
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Beta_Beetle1	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Beta_Beetle2	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Lotus_AP004525	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Medicago_AC131249	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Arabidopsis_AL161506	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Zea_CRM	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Oryza_CRR	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Hordeum_cereba	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Zea_Reina	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Musa_monkey	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
Takifugu_Sushi	VCEGCLACHFC	HNKTV	DULQ	HEFTW	PKLAC	QVSV	LARC	STCCQ	QKKS
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
Beta_Beetle1	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Beta_Beetle2	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Lotus_AP004525	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Medicago_AC131249	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Arabidopsis_AL161506	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Zea_CRM	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Oryza_CRR	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Hordeum_cereba	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Zea_Reina	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Musa_monkey	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
Takifugu_Sushi	VDPRSKMAHFI	CKTKD	ADAV	DLFFKE	IVRLH	GVV	IVIS	DRDA	KFLSHF
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Beta_Beetle1	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Beta_Beetle2	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Lotus_AP004525	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Medicago_AC131249	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Arabidopsis_AL161506	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Zea_CRM	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Oryza_CRR	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Hordeum_cereba	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Zea_Reina	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Musa_monkey	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
Takifugu_Sushi	TLVWRKSKD	QDLKLA	AEFAYNRS	PPTAT	ACSPFF	EWV	GVN	PLSP	LDLLEIP
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
Beta_Beetle1	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Beta_Beetle2	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Lotus_AP004525	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Medicago_AC131249	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Arabidopsis_AL161506	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Zea_CRM	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Oryza_CRR	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Hordeum_cereba	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Zea_Reina	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Musa_monkey	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
Takifugu_Sushi	ANKRRKEV	HYRPGD	LVVLH	LKRRF	PSRR	KKKLMP	RRD	CPFF	VLKIN
	460	470	480	490	500	510	520	530	
Beta_Beetle1	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Beta_Beetle2	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Lotus_AP004525	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Medicago_AC131249	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Arabidopsis_AL161506	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Zea_CRM	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Oryza_CRR	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Hordeum_cereba	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Zea_Reina	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Musa_monkey	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			
Takifugu_Sushi	FSKPG	NDAG	ASMINP	SLTKSHQ	EEIRKRI	QFISL			

Zusätzlich wurden Ty3-gypsy-Sequenzen aus *Lotus japonicus* (AP004525), *Medicago truncatula* (AC131249) und *Arabidopsis thaliana* (AL161506) integriert, die durch Gorinšek *et al.* (2004) in der GenBank identifiziert wurden und sich in den separaten Zweig der centromerischen Chromoviren einreihen lassen. Diese Sequenzen wurden bisher noch keinem definierten Ty3-gypsy-Retrotransposon zugeordnet.

Die Einbeziehung der Integrasesequenzen der nicht-centromerischen Chromoviren Reina aus *Zea mays* (U69258; Avramova *et al.*, 1996), monkey aus *Musa acuminata* (AF143332; Balint-Kurti, 2000) und Sushi aus *Takifugu rubripes* (AF030881, Poulter & Butler, 1998) soll Unterschiede zwischen centromerischen und nicht-centromerischen Vertretern illustrieren.

Aus der Assemblierung der Chromointegrasen wird eine Einteilung in zwei Gruppen deutlich. In der ersten Gruppe befinden sich neben *Beetle1* und *Beetle2* die centromerischen Retrotransposons aus der *Poaceae*-Familie. Weiterhin lassen sich die drei Ty3-gypsy-Sequenzen aus *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* und *Arabidopsis thaliana* als Vertreter aus dikotylen Pflanzen in diese Gruppe einordnen. Deutliche Unterschiede zu den Integrasesequenzen der Chromoviren Reina, monkey und Sushi sind erkennbar. Besonders ausgeprägt sind diese Unterschiede in der C-terminalen Region, in der das ansonsten konservierte Sequenz-Motiv HPVFHS (Pos. 429-435) nur in den nicht-centromerischen Chromoviren Reina, monkey und Sushi aufzufinden ist.

Sind die centromerischen Chromoviren untereinander in ihren Aminosäuren-Motiven stark konserviert, so lässt sich doch für *Beetle1* und *Beetle2* an einigen Positionen eine höhere Homologie zu den Sequenzen aus den Dikotyledonen *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* und *Arabidopsis thaliana* als zu den monokotylen Vertretern aus der Familie der Süßgräser feststellen. Deutlich wird dies im Alignment z. B. an der Position 312. Hier weisen sowohl *Beetle1* und *Beetle2* als auch die Integrasesequenzen aus *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* und *Arabidopsis thaliana* die Aminosäure Asparagin (N) auf. Die CR-Elemente besitzen an dieser Position die Aminosäure Leucin (L).

Bei der Betrachtung der assemblierten Sequenzen fällt der 3'-Bereich durch seine geringe Konservierung auf. Innerhalb dieser Region liegt in Chromoviren die Chromodomäne vor (Gorinšek *et al.*, 2004). Für die Untersuchung der Chromodomäne (Abb. 3.31) wurden neben den Sequenzen aus den Chromoviren authentische Chromodomänen von Chromatin-modifizierenden Proteinen, wie HP1 (heterochromatin-associated protein 1) aus *Drosophila melanogaster* (James & Elgin, 1986), dessen homologe Sequenz aus *Homo sapiens* (Saunders, 1993) und Swi6 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Lorentz *et al.*, 1994)

einbezogen. Die Sekundärstruktur der Chromodomäne wurde entsprechend der für HP1 aus *Drosophila melanogaster* ermittelten 3D-Struktur (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002) im unteren Abbildungsteil dargestellt.

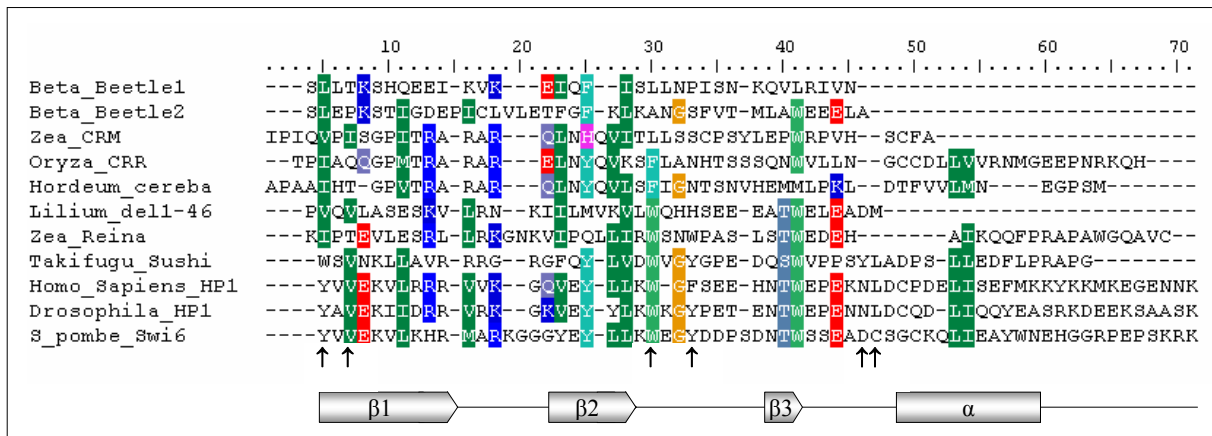


Abb. 3.31: Diversität von Chromodomänen

Das Alignment der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen wurde mit ClustalW erstellt. Die Farbgebung erfolgte mit BioEdit (Hall, 1999), dafür wurde eine Homologie von mind. 50 % zugrunde gelegt. Vertreter der gleichen Aminosäurerest-Gruppe sind in gleicher Farbe unterlegt. Die Sekundärstruktur ist entsprechend der für das HP1 ermittelten 3D-Struktur (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002) im unteren Abbildungsteil dargestellt.

Innerhalb der untersuchten Region ist ein gewisser Konservierungsgrad zwischen den Aminosäure-Sequenzen sichtbar (Pos. 18, 25, 28, 42). Dabei zeigt sich deutlich, dass die nicht-centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons *dell-46*, *Reina* und *Sushi* weitaus häufiger mit den Aminosäuren oder den Aminosäuregruppen der Chromatin-modifizierenden Proteine HP1 und Swi6 übereinstimmen (Pos. 16, 40, 41, 44). Diese konservierten Aminosäuren befinden sich allerdings nicht an den von Jacobs & Khorasanizadeh (2002) für HP1 definierten Positionen, die für die Erkennung des Histon H3 verantwortlich sind (Abb. 3.31 Pfeile). Ausnahmslos alle Ty3-gypsy-Retrotransposon mit centromerischer Lokalisation weisen an diesen Positionen andere Aminosäuren auf. Auffällig ist diese unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung besonders an Position fünf, an der die Aminosäure Tyrosin (Y) in den Chromatin-modifizierenden Proteinen aufzufinden ist. Die aromatische Aminosäurerest-Gruppe des Tyrosins erkennt das methylierte Lysin 9 (MeK9) im Histon H3 und ermöglicht die Interaktion zwischen DNA und Protein. *Beetle1* und *Beetle2* weisen zwar an dieser Position eine andere Aminosäure auf, die jedoch mit den Aminosäuren in den CR-Elementen aus Mais, Reis und Gerste konserviert ist. Neben Leucin (L) und Isoleucin (I) ist an dieser Position Valin (V) in diesen Ty3-gypsy-Retrotransposons vorzufinden. Alle drei Aminosäuren lassen sich aufgrund ihres aliphatischen Aminosäurerests in eine Aminosäuregruppe mit gleichen Eigenschaften einordnen. Auch in *dell-46* und *Reina* als Vertreter nicht-centromerischer Retrotransposons sind die aliphatischen Aminosäuren konserviert.

3.9 Homologiebeziehungen von *Beetle1* und *Beetle2* mit anderen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Eine vertiefte Analyse der Homologiebeziehungen zwischen *Beetle1* und *Beetle2* und ausgewählten Ty3-gypsy-Retrotransposons war durch den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der vollständigen *gag-pol*-Polyproteine möglich. Dazu wurden die ermittelten Aminosäuresequenzen mit ClustalW verglichen. Das daraus resultierende Alignment wurde durch TreeView graphisch als Dendrogramm dargestellt (Abb. 3.32).

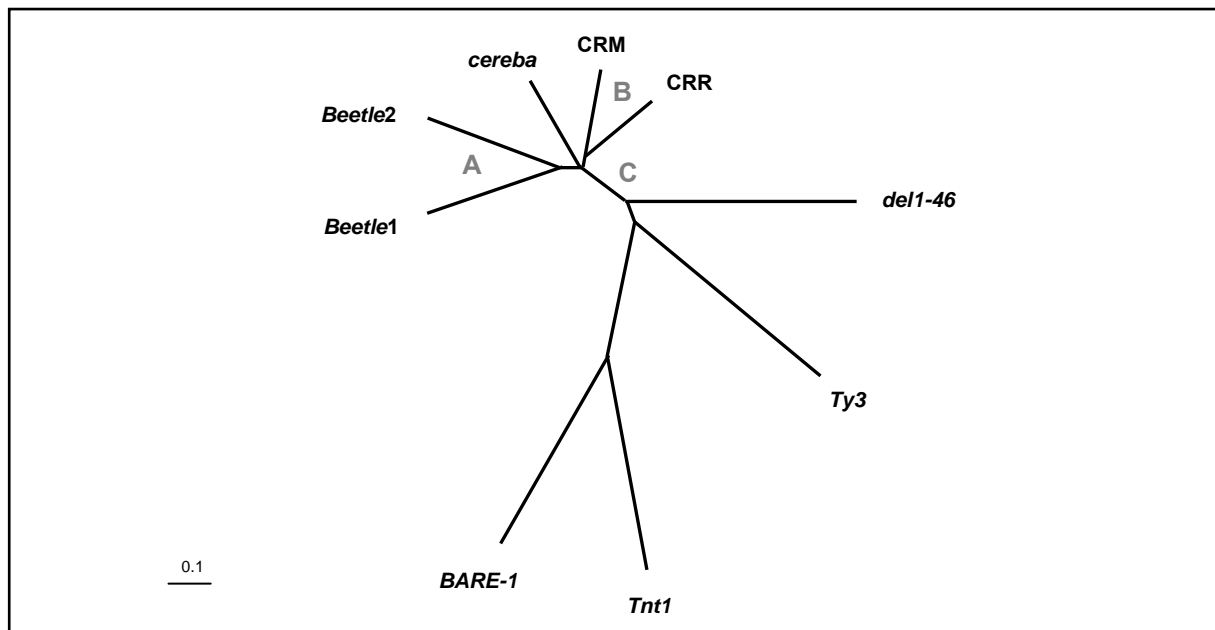


Abb. 3.32: Homologiebeziehungen zwischen *Beetle1*, *Beetle2* und anderen LTR-Retrotransposons

Das Dendrogramm wurde nach dem Alignment der abgeleiteten Aminosäuren des *gag-pol*-Polyproteins durch ClustalW mit TreeView erstellt. Die verwendeten LTR-Retrotransposons sind die Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* (AJ539424) und *Beetle2* aus *B. procumbens*, CRM aus *Zea mays* (AAM94350), CRR aus *Oryza sativa* (Rire7; BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517), *del1-46* aus *Lilium henryi* (1510387A), Ty3 aus *Saccharomyces cerevisiae* (M34549), sowie die Ty1-copia-Elemente *BARE-1* aus *Hordeum vulgare* (AY485643) und *Tnt1* aus *Nicotiana tabacum* (X13777) als Outgroup. Die Länge der Verbindungslinien repräsentiert die Divergenz zwischen den Sequenzen. A, B und C definieren einzelne Äste bzw. Aufspaltungen.

Die abgeleiteten Aminosäuren der *gag-pol*-Polyproteine von *Beetle1* und *Beetle2* und der centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM, CRR und *cereba* als auch die Polyproteine der nicht-centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons *del1-46* und Ty3 aus *Saccharomyces cerevisiae* (M34549; Hansen & Sandmeyer, 1990) wurden in die Studien einbezogen. Als „Outgroup“-Elemente wurden die Polyproteinbereiche der Ty1-copia-Retrotransposons *BARE-1* aus *Hordeum vulgare* (AY485643; Kalendar *et al.*, 2000) und *Tnt1* aus *Nicotiana tabacum* (X13777; Grandbastien *et al.*, 1989) in die Untersuchungen eingeschlossen.

Die *Beta*-spezifischen Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* formieren innerhalb des Dendrogramms einen eigenen Ast (A) und liegen in ihrer verwandtschaftlichen Beziehung eng aneinander. Der dicht angrenzende Ast (B) gruppiert die drei in den *Poaceae* mit dem Centromer-assoziierten Ty3-gypsy-Retrotransposons *cereba*, CRR und CRM und resultiert, wie der Ast der *Beetle*-Elemente, aus einer Aufspaltung eines gemeinsamen Astes (C) des phylogenetischen Stammbaums. Die Ty3-gypsy-Retrotransposons aus der Lilie (*dell-46*) und der Bäckerhefe (Ty3) bilden separate Äste. *BARE-1* und *Tnt1*, als Vertreter aus der Klasse der Ty1-copia-Retrotransposons bilden mit einem großen Abstand einen separaten Zweig.

In weiteren Untersuchungen wurden die Homologiegrade der einzelnen Domänen des multifunktionellen Polyproteins der Ty3-gypsy-Retrotransposons auf DNA- und Aminosäure-Ebene bestimmt und sind in der Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die für die Homologiesuche verwendeten Bereiche von *Beetle1* befinden sich für die Protease von Aminosäure 404 - 515 des *gag-pol*-Polyproteins (Abb. A1; 111 AS), die Reverse Transkriptase von Aminosäure 585-885 (300 AS), die RNaseH von Aminosäure 890-1031 (141 AS) und die Integrase von Aminosäure 1043-1301 (258 AS).

Tab. 3.6: Homologie der einzelnen Gene des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1* mit *Beetle2* und anderen pflanzlichen Ty3-gypsy-Retrotransposons

Element	Protease	Reverse Transkriptase	RNase H	Integrase	Referenz
<i>Beetle2</i>	60,2 % 50,9 %	67,9 % 68,7 %	69,7 % 73,8 %	66,9 % 66,9 %	vorliegende Dissertation
CRM	65,2 % 58 %	65,8 % 70,4 %	61,7 % 63,1 %	63,4 % 63,5 %	Zhong <i>et al.</i> , 2002
CRR	64 % 55,4 %	67,1 % 70,4 %	62,5 % 63,1 %	62,6 % 61,9 %	Kumekawa <i>et al.</i> , 2001
<i>cereba</i>	62 % 51,8 %	66,2 % 68,8 %	61,7 % 63,8 %	61,7 % 60,8 %	Hudakova <i>et al.</i> , 2001
<i>dell-46</i>	47 % 20,6 %	58,9 % 49,2 %	53,1 % 44,7 %	52 % 38 %	Smyth <i>et al.</i> , 1989

Der entsprechende Sequenzbereich der einzelnen Gene des *gag-pol*-Polyproteins stammt aus den Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle2* aus *B. procumbens* (vorliegende Dissertation), CRM aus *Zea mays* (AAM94350), CRR (Rire7) aus *Oryza sativa* (BAA89466), *cereba* aus *Hordeum vulgare* (AAK94517) und *dell-46* aus *Lilium henryi* (1510387A). Die resultierenden Homologiewerte aus dem Vergleich auf DNA-Ebene sind in der Tabelle weiß, die Werte aus dem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuren grau unterlegt.

Die Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* wiesen auf DNA-Ebene je nach untersuchtem Genbereich eine Homologie zwischen 60,2 % (Protease) und 69,7 % (RNaseH) auf. Die relativ hohe Konservierung innerhalb der Reversen Transkriptase/RNaseH spiegelte sich auch im Vergleich der Aminosäuren wieder. 68,7 % homologe Aminosäuren wurden innerhalb der Reversen Transkriptase gefunden. Der Vergleich der RNaseH-Regionen weist

mit 73,8 % homologen Aminosäuren die höchsten Homologiewerte aus. Ähnliche Werte resultierten aus dem Vergleich von *Beetle1* mit den CR-Elementen *cereba*, CRM und CRR. Hier lagen die Homologien bei Betrachtung der DNA-Sequenz innerhalb einer Spanne von 61,7 % (Protease, *cereba*) bis 67,1 % (RNaseH, CRR). Die Homologie zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Reversen Transkriptasen lag mit 70,4 % identischen Aminosäuren in CRM und CRR nur geringfügig über den Werten aus dem Vergleich von *Beetle1* und *Beetle2* (68,7 %). Das aus Gerste isolierte *cereba* war zu 68,8 % homolog.

Die Retrotransposons *Beetle1* und *dell-46* lagen in ihren Homologiewerten weniger eng beieinander. Besonders die niedrigen Aminosäure-Homologien von 20,6 % in der Protease und 49,2 % in der zwischen den Retroelementen stark konservierten Region der Reversen Transkriptase manifestierten die sich bereits im Dendrogramm (Abb. 3.28) abzeichnenden Beziehungen. Diese Tendenz lässt sich auch für *Beetle2* feststellen, wo die Homologie im verglichenen Bereich der Reversen Transkriptase bei 49 % lag.

3.10 Divergenz der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2*

Basierend auf Sequenzdaten aus der LTR-Region und internen Polyproteinomänen innerhalb der selektierten PRO1-BACs und der Sektion *Procumbentes* erfolgte die Untersuchung der Heterogenität dieser Retrotransposon-Sequenzen.

Zunächst sollen die LTR-Sequenzen betrachtet werden. Dabei muß beachtet werden, dass eine Unterscheidung in 5'-LTR und 3'-LTR nicht möglich war. Die Auswertung von LTR-Sequenzen aus *Beetle1* ergab zwischen 20 PCR-Produkten aus dem BAC 102A16, der keine vollständige *Beetle1*-Kopie trägt, eine Sequenzabweichung von bis zu zwei Prozent. Die 20 amplifizierten LTR-Sequenzen aus dem BAC 125N12 differenzierten sich in sieben verschiedene LTR-Sequenzen, die Divergenzabweichungen von bis zu 4,3 % aufwiesen.

Der Vergleich von Sequenzen des *Beetle1*-LTR, die aus der BAC-Endsequenzierung resultierten (Tab. 3.6), zeigte die Anwesenheit von sehr divergierten LTR-Kopien. Abweichungen von bis zu 12,6 % wurden in der LTR-Sequenz aus dem BAC 124I17-T7 ermittelt, die hauptsächlich durch Basenpaarsubstitutionen bedingt sind. Es wurden bei der Auswertung der Sequenzdaten keine identischen LTR-Sequenzen identifiziert.

Tab. 3.7: Divergenz zwischen dem *Beetle1*-LTR und LTR-Sequenzen aus BAC-Endsequenzen

Homologie Divergenz	1	2	3	4	5	6	7	8	
1		91,0	90,8	92,0	94,2	93,4	88,4	97,7	1
2	9,6		99,7	96,2	93,6	92,8	97,1	86,7	2
3	9,9	0,3		96,5	93,6	92,5	97,1	86,7	3
4	8,4	3,9	3,6		95,6	94,4	93,5	87,6	4
5	6,0	6,7	6,7	4,6		98,6	91,9	91,9	5
6	7,0	7,6	7,9	5,8	1,5		91,0	90,7	6
7	12,6	2,9	2,9	6,8	8,6	9,5		85,3	7
8	0,9	9,3	9,3	8,5	5,7	7,0	11,3		8
	1	2	3	4	5	6	7	8	

Die Distanzen wurden mit MegAlign durch paarweisen Sequenzvergleich erstellt. Der definierte Bereich im LTR von *Beetle1* erstreckt sich von Position 299 bp bis 642 bp. Die Werte sind in Prozent angegeben. Es wurden die BAC-Endsequenzen der BACs 51N23-T7 (1), 86O2-SP6 (2), 102A16-SP6 (3), 104N4-SP6 (4), 104N4-T7 (5), 124I17-SP6 (6) und 124I17-T7 (7) und der *Beetle1*-LTR (8) verglichen.

Die Divergenzanalysen definierter Sequenzabschnitte aus dem *gag-pol*-Polyprotein von *Beetle1* und *Beetle2* erfolgten mit allen drei Arten aus der Sektion *Procumbentes*. PCR-Amplikons aus der Region der Protease, Reversen Transkriptase, RNaseH und Integrase wurden kloniert und mindestens vier rekombinante Plasmide für *B. procumbens*, *B. webbiana* und *B. patellaris* sequenziert.

Die *Beetle1*-spezifischen Sequenzbereiche zeigten in allen *Procumbentes*-Arten Homologien von über 90 % (Tabelle 3.8). Die Auswertung ergab sowohl für die einzelnen Bereiche als auch Arten annähernd gleiche Werte, was auf eine geringe Divergenz der *Beetle1*-Sequenzen schließen lässt.

Tab. 3.8: Divergenzanalyse von Sequenzen aus dem *gag-pol*-Polyprotein von Retrotransposons der *Beetle1*-Familie

Sequenzbereich	Art	analysierte Klonzahl	Homologie
<i>Beetle1</i> -Protease (2400-2737 bp)	<i>B. procumbens</i>	6	97,1-98,2%
	<i>B. webbiana</i>	6	95,9-98,2%
	<i>B. patellaris</i>	5	94,2-97,4%
<i>Beetle1</i> -RVT (3444-3701 bp)	<i>B. procumbens</i>	6	97,7-100%
	<i>B. webbiana</i>	6	96,9-100%
	<i>B. patellaris</i>	6	97,3-100%
<i>Beetle1</i> -RNaseH (3854-4169 bp)	<i>B. procumbens</i>	5	96,8-100%
	<i>B. webbiana</i>	5	98,1-100%
	<i>B. patellaris</i>	6	98,7-100%
<i>Beetle1</i> -Integrase (4543-4890 bp)	<i>B. procumbens</i>	6	97,2-100%
	<i>B. webbiana</i>	5	91,8-99,7%
	<i>B. patellaris</i>	6	99,1-100%

Die Position des durch PCR amplifizierten DNA-Abschnittes innerhalb eines vollständigen *Beetle1*-Retrotransposons ist in Klammern unter dem entsprechenden Sequenzbereich angegeben.

Die *Beetle2*-spezifischen Sequenzbereiche wiesen in allen Arten mit über 90 % (Tabelle 3.9) einen ähnlichen Homologiegrad wie die entsprechenden DNA-Abschnitte aus *Beetle1* auf, was ebenfalls für eine geringe Divergenz innerhalb der *Beetle2*-Sequenzen spricht.

Tab. 3.9: Divergenzanalyse von Sequenzen aus dem *gag-pol*-Polyprotein von Retrotransposons der *Beetle2*-Familie

Sequenzbereich	Art	analysierte Klonzahl	Homologie
<i>Beetle2</i> -Protease (2674-3041 bp)	<i>B. procumbens</i>	6	97,3-98,9%
	<i>B. webbiana</i>	5	97,8-99,2%
	<i>B. patellaris</i>	5	95,1-98,9%
<i>Beetle2</i> -RVT (3756-4048 bp)	<i>B. procumbens</i>	6	97,3-99%
	<i>B. webbiana</i>	4	95,2-99,3%
	<i>B. patellaris</i>	5	97,6-99%
<i>Beetle2</i> -RNaseH (4150-4472 bp)	<i>B. procumbens</i>	6	97,8-98,8%
	<i>B. webbiana</i>	6	96,9-98,5%
	<i>B. patellaris</i>	6	96,9-98,5%
<i>Beetle2</i> -Integrase (4746-5074 bp)	<i>B. procumbens</i>	5	96,3-97,6%
	<i>B. webbiana</i>	5	91,8-97,9%
	<i>B. patellaris</i>	6	95,4-97,6%

Die Position des durch PCR amplifizierten DNA-Abschnittes innerhalb eines vollständigen *Beetle2*-Retrotransposons ist in Klammern unter dem entsprechenden Sequenzbereich angegeben.

3.11 Genomorganisation der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2*

3.11.1 Abundanz von *Beetle1* und *Beetle2* in *Beta procumbens*

Um zu untersuchen, mit welcher Abundanz *Beetle1*- und *Beetle2*-Retrotransposons in *Beta procumbens* vorkommen und wie sich ihre genomische Organisation darstellt, wurden Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Hierfür wurde die genomische DNA von *Beta procumbens* mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt und identische Southern-Filter hergestellt. Diese Filter wurden mit charakteristischen Sequenz-Domänen aus unterschiedlichen Bereichen der LTR-Retrotransposons hybridisiert.

Die radioaktiv markierten DNA-Sonden erzeugten durchgehend intensive Hybridisierungssignale, die auf einen hochrepetitiven Charakter der *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen innerhalb der Wildrübenarten aus der Sektion *Procumbentes* schließen lassen (Abb. 3.33). In fast allen Spuren wurden unterschiedliche Muster aus eins bis sechs Banden im Größenbereich zwischen 200-7000 bp mit teilweise starkem Schmier detektiert. Dieser Schmier deutet auf eine hohe Abundanz homologer Sequenzen im Genom hin. Neben den konservierten Schnittstellen, die sich in definierten Banden äußern können, zum einen nichtkonservierte Schnittstellen in Banden verschiedener Größe resultieren, die sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung über einen größeren Bereich erstrecken und als „Bandenschmier“ sichtbar sind. Zum anderen kann die Integration der hochabundanten LTR-

Retrotransposons in unterschiedliche Regionen des Genoms dieses Hybridisierungsmuster verursachen. Die unterschiedlichen *Beetle1*- und *Beetle2*-flankierenden Sequenzen weisen unterschiedliche Positionen der Schnittstellen auf und resultieren in der Ansammlung unterschiedlicher Restriktionsfragmente. Die einzelnen Domänen eines Retrotransposons unterschieden sich dabei in ihrem Bandenmuster. Ferner wiesen homologe Sonden der Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* unterschiedliche Hybridisierungsorte auf.

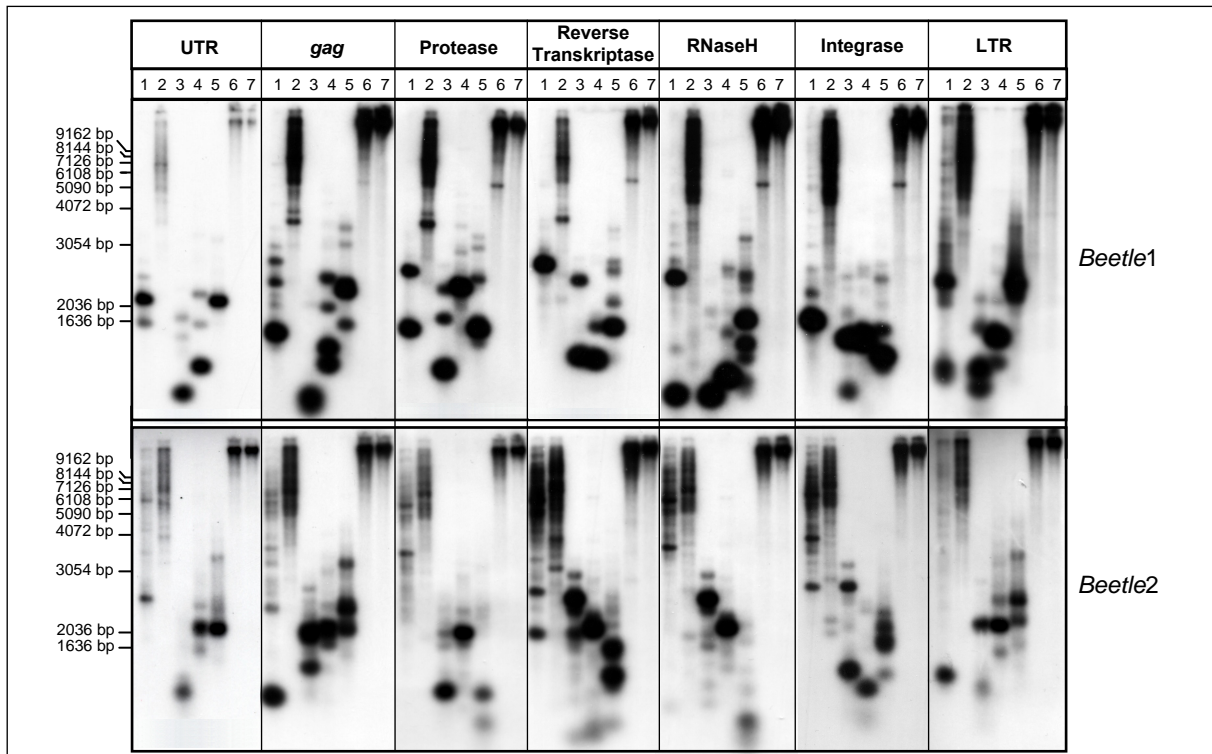


Abb. 3.33: Genomische Organisation der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* im Genom von *Beta procumbens*

Autoradiogramme identischer Southern-Filter mit genomischer DNA aus *B. procumbens*, die mit *Hind*III (1), *Eco*RI (2), *Hinf*I (3), *Rsa*I (4), *Sau*3AI (5), *Msp*I (6), *Hpa*II (7) behandelt und mit charakteristischen Domänen (UTR, *gag*, Protease, Reverse Transkriptase, RNaseH, Integrase, LTR) der LTR-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* hybridisiert wurden.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme (Abb. 3.33), die aus der Hybridisierung mit der Reversen Transkriptase-Sonde von *Beetle1* und *Beetle2* hervorgingen, ließ sich neben der relativen Spezifität dieser Sonde, die ein charakteristisches Bandenmuster für jedes Retrotransposon hervorbrachte, auch eine Konservierung zwischen den Elementfamilien durch gleiche Hybridisierungssignale feststellen. Diese Kreuzhybridisierungen waren besonders deutlich in den *Hind*III-Fragmenten (Spur 1), *Eco*RI-Fragmenten (Spur 2) und *Sau*3AI-Fragmenten (Spur 5) zu identifizieren.

Auch Kreuzhybridisierungen zu anderen Ty3-gypsy-Retrotransposons, die weder der *Beetle1*- noch *Beetle2*-Familie zuzuordnen sind, sind sehr wahrscheinlich. Die Sonden für LTR, UTR

und *gag* hingegen schienen für das jeweilige Retroelement spezifisch zu sein, da zwischen *Beetle1* und *Beetle2* nur wenige gemeinsame Hybridisierungssignale detektierbar waren. Die Differenzierung zwischen Restriktionsfragmenten mit ähnlicher Laufweite konnte nur durch die Überlagerung der Autoradiogramme erfolgen. Da die Southern-Filter unter gleichen Bedingungen (gleiches Agarosegel) erstellt wurden, resultierte für gleiche Restriktionsfragmente die gleiche Laufweite.

Durch den Einsatz der Restriktionsendonukleasen *HpaII* und *MspI* konnte eine Quantifizierung des Methylierungsniveaus vorgenommen werden. Beide Restriktionsenzyme verfügen über die Erkennungssequenz 5'-CCGG-3' und zeigten in allen Autoradiogrammen Restriktionsfragmente, die in ihrer Größe über 25 kb lagen. Ihre Aktivität wird jedoch vom Ausmaß der Cytosin-Methylierung bestimmt. *HpaII* schneidet, wenn keine Cytosin-Methylierung in der Erkennungssequenz vorliegt. Es schneidet nicht mehr, wenn eines der beiden Cytosin-Nukleotide methyliert ist. Dagegen schneidet *MspI* immer noch, wenn das innere Cytosin-Nukleotid (CpG) methyliert ist. Es kann jedoch keine Restriktion durchführen, wenn das äußere Cytosin-Nukleotid methyliert ist (CpNpG). Aufgrund der Fragmentgrößen sowie dem Vergleich zwischen den Restriktionsmustern beider Enzyme konnte eine Aussage über die Cytosin-Methylierung getroffen werden. Für den Fall einer erhöhten DNA-Methylierung können die verwendeten Endonukleasen nicht an allen möglichen Schnittstellen die DNA schneiden, so dass deutlich höhermolekulare Restriktionsfragmente entstehen. *MspI* erzeugt in *B. procumbens* ein 5 kb großes Restriktionsfragment, das mit den DNA-Sonden aus dem *gag-pol*-Polyprotein (*gag*, Protease, RT, RNaseH, Integrase) hybridisiert. Diese detektierte *Beetle1*-Sequenz weist einen anderen Methylierungsstatus als der überwiegende Anteil an *Beetle1*-Sequenzen auf, die in der komprimierten DNA-Region oberhalb von 12 kb liegen. Grundsätzlich ist der Methylierungsgrad für beide LTR-Retrotransposons als sehr hoch einzuschätzen.

3.11.2 Abundanz *Beetle1* und *Beetle2* in *Beta*-Arten

Um zu ergründen, ob und mit welcher Abundanz die *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen in verwandten Pflanzengenomen zu finden sind, erfolgten Southern-Hybridisierungen mit *HinfI*-restringierter genomischer DNA aus allen vier Sektionen der Gattung *Beta* (Tab. 2.9) und *Spinacia oleracea* L. (Spinat) als weiteren Vertreter aus der Familie der *Chenopodiaceae*.

Unter Einsatz der DNA-Sonden aus dem LTR und der Reversen Transkriptase von *Beetle1* und *Beetle2* war neben der Detektion der für beide Elemente charakteristischen DNA-Sequenzen überdies ein Nachweis weiterer bisher unbekannter Reverser Transkriptase-

Sequenzen möglich, die in schwächeren Hybridisierungssignalen resultierten (Abb. 3.34, A und B). Der für das jeweilige Retrotransposon charakteristische LTR ermöglichte Aussagen über die Abundanz der Retrotransposon-Sequenzen von *Beetle1* und *Beetle2* innerhalb der Gattung *Beta* (Abbildung 3.34, C und D).

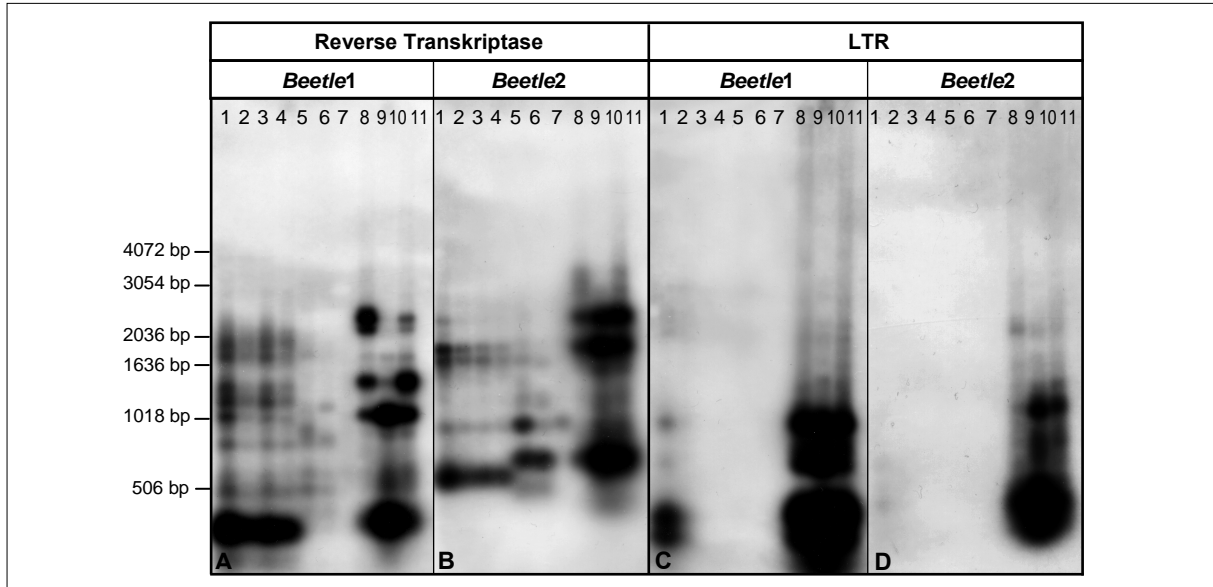


Abb. 3.34: Southern-Hybridisierung von genomischer DNA verschiedener *Beta*-Arten mit Sonden aus *Beetle1* und *Beetle2*

A) Southern-Filter nach Hybridisierung mit der Reversen Transkriptase-Sonde aus *Beetle1*. B) Southern-Filter nach Hybridisierung mit der Reversen Transkriptase-Sonde aus *Beetle2*. C) Southern-Filter nach Hybridisierung mit der Sonde aus dem *Beetle1*-LTR. D) Southern-Filter nach Hybridisierung mit der Sonde aus dem *Beetle2*-LTR. In den Spuren 1-11 befinden sich die mit *HinfI*-restringierten genomischen DNAs von PRO1 (1), PAT2 (2), *B. vulgaris* (3), *B. maritima* (4), *B. lomatogona* (5), *B. corolliflora* (6), *B. nana* (7), *B. procumbens* (8), *B. webbiana* (9), *B. patellaris* (10) und *Spinacia oleracea* (11) als *Chenopodium*-Art außerhalb der Gattung *Beta*.

Die DNA-Sonden zeigten innerhalb der Gattung *Beta* unterschiedliche Hybridisierungsmuster. Nach der Hybridisierung mit der Sonde aus der Reversen Transkriptase (RT-Sonde) wurden sowohl mit der *Beetle1*-spezifischen als auch der *Beetle2*-spezifischen Sonde innerhalb der Gattung *Beta* homologe DNA-Sequenzen nachgewiesen. Durch das Auftreten gleicher Hybridisierungsmuster war eine Einteilung der verwendeten Arten in vier Gruppen möglich.

Die erste Gruppe bildeten die restringierten genomischen DNAs der Spuren 1 bis 4. Hierbei handelte es sich um die monosomen Fragmentadditionslinien PRO1 (Spur 1) und PAT2 (Spur 2), die neben 18 *B. vulgaris*-Chromsomen zusätzliches Wildrübenchromatin besitzen und die Arten *B. vulgaris* (Spur 3) und *B. maritima* (Spur 4) aus der Sektion *Beta*. Diese Arten zeigten ähnliche Hybridisierungssignale. Jedoch war ein deutlicher Unterschied im Bandenmuster zwischen der RT-Sonde von *Beetle1* und *Beetle2* zu verzeichnen. Ein sehr starkes Hybridisierungssignal nach Verwendung der *Beetle1* RT-Sonde (Abb. 3.34, A) war im

Größenbereich unterhalb von 400 bp erkennbar. Das Hybridisierungssignal mit der *Beetle2* RT-Sonde (Abb. 3.34, B) war mit einer Größe um 700 bp deutlich größer.

Die zweite Gruppe umfasste mit *B. lomatogona* (Spur 5) und *B. corolliflora* (Spur 6) Vertreter aus der Sektion *Corollinae*. Diese Arten wiesen nach Hybridisierung mit der RT-Sonde von *Beetle1* ein schwaches Bandenmuster, ohne eine erkennbare Clusterung von Restriktionsfragmenten innerhalb eines Größenbereiches auf. Dem gegenüber steht die intensive Bande bei etwa 800 bp, die sich nach der Hybridisierung mit der RT-Sonde von *Beetle2* ergab.

Die zur Sektion *Procumbentes* zählenden Arten *B. procumbens* (Spur 8), *B. webbiana* (Spur 9) und *B. patellaris* (Spur 10) bildeten mit dem gleichen intensiven Bandenmuster nach Hybridisierung mit Sequenzen aus dem Reverse Transkriptase-Gen beider Retrotransposons die dritte Gruppe. Die Hybridisierung resultierte in einem sektionsspezifischen Bandenmuster, das auf die Konservierung der Schnittstellen innerhalb der Retrotransposons schließen lässt.

B. nana (Spur 7) als einzige Art der Sektion *Nanae* nimmt in der Taxonomie der Gattung *Beta* eine Sonderstellung ein. In der Southern-Hybridisierung mit der RT-Sonde von *Beetle1* war kein Hybridisierungssignal detektierbar. Die Anzahl der mit der *Beetle2*-spezifischen RT-Sonde markierten Restriktionsfragmente beschränkte sich auf ein Signal. Der Spinat, als außerhalb der Gattung *Beta* mitgeführte *Chenopodium*-Art wies mit keiner der eingesetzten DNA-Sonden ein Hybridisierungssignal auf. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es keine signifikanten Sequenzhomologien zwischen Ty3-gypsy-Retrotransposons aus *B. procumbens* und aus Spinat gibt.

Der LTR als charakteristische Sequenz, die eine Retrotransposons-Familie definiert, diente der Betrachtung der Verbreitung von *Beetle1* und *Beetle2* in der Gattung *Beta*. Die Untersuchung zeigte eine begrenzte Ausdehnung von *Beetle1* und *Beetle2*. Ausschließlich die Arten der Sektion *Procumbentes* (Spur 8-10; dritte Gruppe) und die Chromosomenmutanten PRO1 (Spur 1) und PAT2 (Spur 2) zeigten nach der Hybridisierung mit dem LTR von *Beetle1* (Abb. 3.34, C) und *Beetle2* (Abb. 3.34, D) ein konserviertes Muster. Keine LTR-Sonde detektierte homologe Sequenzen in den Sektionen *Beta*, *Corollinae* und *Nanae*.

Der Nachweis der LTR-Sequenzen beider Retrotransposons war in der monosomen Additionslinie PAT2 (Spur 2) erschwert, da hier der Anteil an Wildrübenchromatin, als Ursprungsgenom der repetitiven *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen, deutlich geringer als in der Chromosomen-mutante PRO1 ist. Die Signalintensität war in PAT2 (Spur 2) besonders nach Hybridisierung mit dem *Beetle2*-LTR (Abb. 3.34, D) deutlich schwächer als in PRO1 (Spur 1), da *Beetle2* vermutlich in geringerer Kopienzahl am Centromer des PAT2-Minichromosoms vorliegt.

3.12 Chromosomale Lokalisation der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Für die FISH wurden klonierte Sequenzen der Reversen Transkriptase und des LTRs beider Retrotransposons als Sonden verwendet. Die chromosomale Lage dieser Sequenzen wurde sowohl an Metaphase- als auch an Interphase-Chromosomen von *Beta procumbens* und den monosomen Fragmentadditionslinien PRO1 und PAT2 ermittelt.

3.12.1 Lokalisierung der *Beetle1*-Sequenzen auf *Beta*-Chromosomen

Die FISH an Chromosomen der monosomen Additionslinie PRO1, die ein zusätzliches Chromosomenfragment der Wildrube *B. procumbens* enthält, wies nach Hybridisierung mit dem Biotin-markierten *Beetle1*-LTR nur ein starkes Hybridisierungssignal (Abb. 3.35, A) auf. Durch die digitale Überlagerung der DAPI- und Biotinaufnahme dieser Metaphase wurde das Signal eindeutig auf dem Minichromosom lokalisiert.

Verifiziert wurde dieses Ergebnis durch simultane Lokalisation des *Beetle1*-LTRs (rote Fluoreszenz) und des pTS5-Satelliten (grüne Fluoreszenz) an PRO1 Interphase- und Metaphase-Chromosomen (Abb. 3.35, C und E). Der für das *B. procumbens*-Centromer kennzeichnende Satellit pTS5 (Digoxigenin-markiert) kennzeichnete ausschließlich das Wildrüben-Chromatin. Bei gleicher Signalintensität zeigte der *Beetle1*-LTR nur einen Hybridisierungsort. Im Overlay resultierten beide Hybridisierungssignale in einem gelben Signal, welches aus der Kolo-kalisation beider Sequenzen hervorging (Abb. 3.35 E, rechts).

Die *in situ*-Hybridisierung an PRO1-Metaphasen mit der Reversen Transkriptase-Sonde (Abb. 3.35, F) zeigte keine Begrenzung der Hybridisierungsorte auf das Minichromosom. Auf allen PRO1-Chromosomen, einschließlich des Minichromosoms wurden unterschiedlich starke Hybridisierungssignale detektiert. Die Hybridisierungssignale liegen auf den 18 *B. vulgaris*-Chromosomen überwiegend am Centromer.

Durch den hohen Konservierungsgrad der Reversen Transkriptase-Sequenz innerhalb der Ty3-gypsy-Retrotransposons sind Kreuzhybridisierungen mit anderen Ty3-gypsy-Familien für die Signale auf den *B. vulgaris*-Chromosomen verantwortlich.

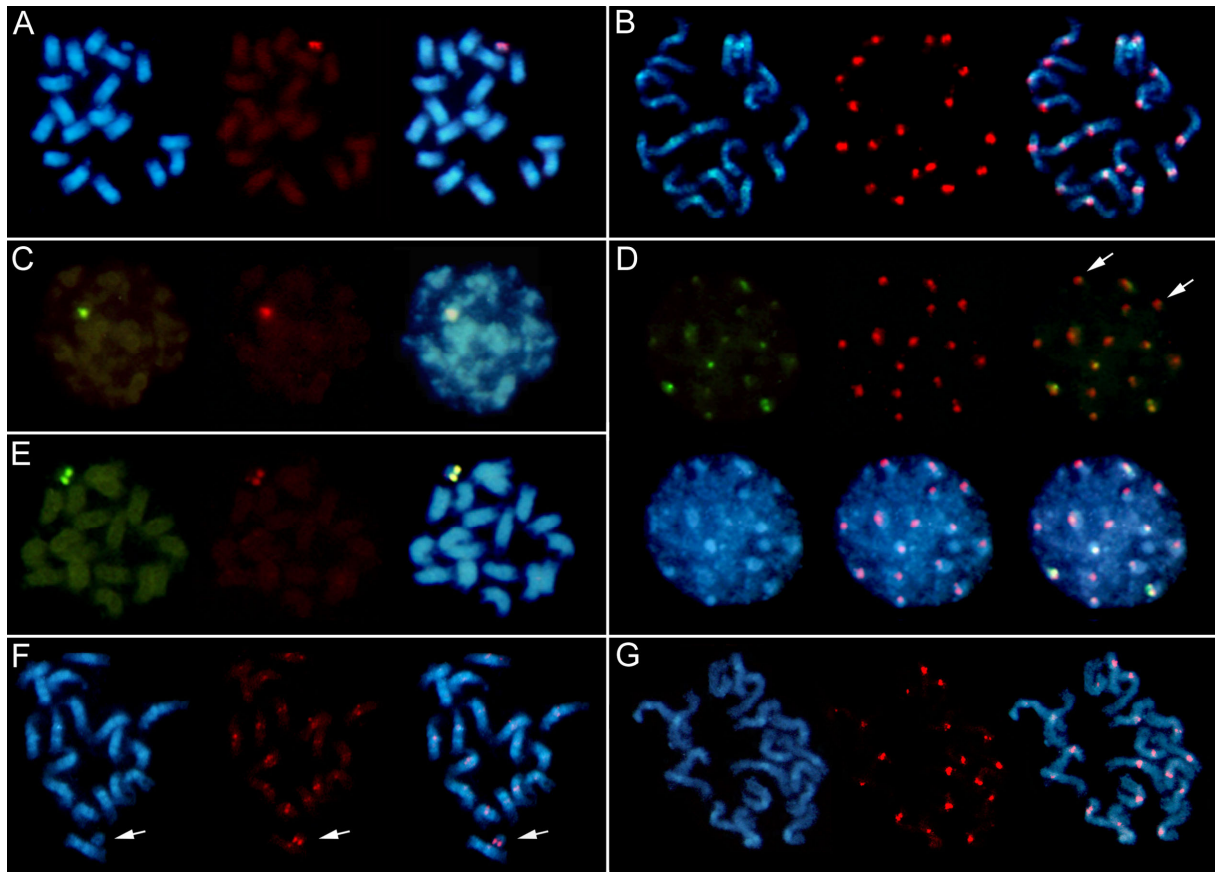


Abb. 3.35: Chromosomale Lokalisation von *Beetle1*-Sequenzen auf *Beta*-Chromosomen durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die blaue Fluoreszenz in jeder Teilabbildung zeigt die DAPI-gefärbten Chromosomen. Hybridisierungsorte der markierten DNA-Sonde an homologe Sequenzen auf den Chromosomen wurden mit Biotin-Streptavidin-Cy3 (rote Fluoreszenz) und Dig-Antidigoxigenin-FITC (grüne Fluoreszenz) detektiert. Rechts ist jeweils die digitale Überlagerung beider Abbildungen dargestellt. A) Die LTR-Sonde von *Beetle1* markiert nach Hybridisierung einer PRO1-Metaphase nur das PRO1-Minichromosom. B) Metaphasechromosomen von *B. procumbens* nach FISH mit dem *Beetle1*-LTR. Die LTR-Sonde hybridisiert exklusiv an allen Centromeren. C) Der PRO1-Interphasekern zeigt nach Hybridisierung mit dem Satelliten pTS5 (grün) und dem *Beetle1*-LTR (rot) nur ein definiertes Signal. Das gelbe Fluoreszenzsignal (rechts) ergibt sich aus der digitalen Überlagerung beider Bilder. D) Die Interphase aus *B. procumbens* zeigt nach Hybridisierung mit pTS5 (grün) und dem LTR von *Beetle1* (rot), sowie die der digitalen Überlagerung beider Bilder die Kolokalisation (gelb) von Satellitenrepeat und Ty3-gypsy-Retrotransposon. Während der *Beetle1*-LTR alle detektierbaren Chromocentren (Fransz *et al.*, 2002) hybridisiert, zeigt der pTS5-Satellit nicht an allen Centromerbereichen ein Signal (Pfeile). E) In der Doppelhybridisierung einer PRO1-Metaphase mit dem Satelliten pTS5 (grün) und der LTR-Sonde von *Beetle1* (rot) ist ausschließlich das Heterochromatin des PRO1-Minichromosoms markiert. F) Die Reverse Transkriptase-Sonde aus *Beetle1* markiert alle Chromosomen einer PRO1-Metaphase. Starke Signale sind im Bereich des Heterochromatins auszumachen; schwächere Intensitäten weisen diperse homologe Sequenzen aus anderen Ty3-gypsy-Retrotransposons entlang der Chromosomen nach. Das Minichromosom (Pfeil), auf dem das *Beetle1*-Element lokalisiert ist, weist eine starke Signalintensität im Bereich des Heterochromatins auf. G) Die *Beetle1*-Probe für die Reverse Transkriptase kann auf Metaphasechromosomen von *B. procumbens* ebenfalls centromerisch lokalisiert werden. Sie detektiert jedoch noch andere Ty3-gypsy-Retrotransposons auf den Chromosomen, die als schwache dispers verteilte Signale entlang der Chromosomenarme sichtbar sind.

Die *B. procumbens*-Chromosomen zeichneten sich nach Hybridisierung mit der LTR-Sonde (Abb. 3.35, B) durch Signale im Bereich des DAPI-positiven Heterochromatins aller Centromere aus. Die Zweifarben-FISH an Interphasekernen aus *B. procumbens* (Abb. 3.35, D) zeigte die Kolokalisation und damit die Interspersion von Satelliten-DNA (pTS5, grüne

Fluoreszenz) und Ty3-gypsy-Retrotransposon (*Beetle1*-LTR, rote Fluoreszenz). Im Overlay beider Fluoreszenzen wurden Heterochromatinblöcke identifiziert (Pfeile), in denen nur *Beetle1* präsent ist. Die RT-Sonde wurde an *B. procumbens*-Prometaphasen (Abb. 3.35, G) ebenfalls durch starke Signale am Centromer lokalisiert. Die durch Southern-Hybridisierung (Abb. 3.34) diagnostizierte Wildrübenspezifität von *Beetle1*, insbesondere des LTRs wurde durch die FISH-Analysen verifiziert.

3.12.2 Lokalisierung der *Beetle2*-Sequenzen auf *Beta*-Chromosomen

Die *in situ*-Hybridisierung des LTRs von *Beetle2* an Chromosomen der monosomen Fragmentadditionslinie PRO1 wies nur ein Hybridisierungssignal (Abb. 3.36, A) auf dem Minichromosom (Pfeil) auf. Dieses exklusive Hybridisierungssignal war auch im Interphasekern von PRO1 (Abb. 3.36, C) zu beobachten.

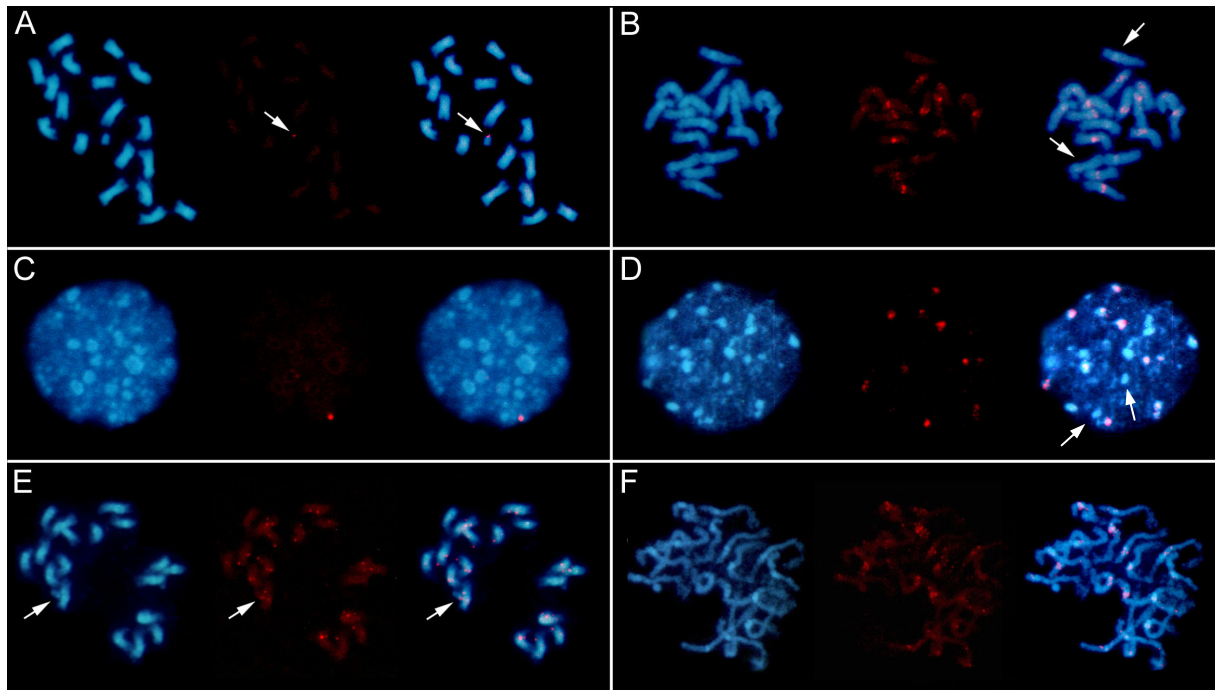


Abb. 3.36: Chromosomale Lokalisation von *Beetle2*-Sequenzen auf *Beta*-Chromosomen durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die blaue Fluoreszenz in jeder Teilabbildung zeigt die DAPI-gefärbten Chromosomen. Hybridisierungsorte der markierten DNA-Sonde an homologe Sequenzen auf den Chromosomen wurden mit Biotin-Streptavidin-Cy3 (rote Fluoreszenz) und Dig-Antidigoxigenin-FITC (grüne Fluoreszenz) detektiert. Rechts ist jeweils die digitale Überlagerung beider Abbildungen dargestellt. A) Der LTR des *Beetle2*-Elements markiert in einer mitotischen PRO1-Metaphase ausschließlich das PRO1-Minichromosom (Pfeil). B) Metaphasechromosomen von *B. procumbens* nach FISH mit dem *Beetle2*-LTR zeigen die Centromerregion als exklusives Hybridisierungstarget; nicht alle Chromosomen (Pfeile) wurden mit der LTR-Sonde markiert. C) Der PRO1-Interphasekern zeigt nach Hybridisierung mit dem *Beetle2*-LTR nur ein definiertes Signal. D) Die Interphase aus *B. procumbens* zeigt nach Hybridisierung mit dem LTR von *Beetle2* detektierbare Signale in den Chromocentren (Fransz *et al.*, 2002). Jedoch zeigen nicht alle Centromerbereiche ein Signal (Pfeile). E) Die Reverse Transkriptase-Sonde aus *Beetle2* markiert alle Chromosomen einer PRO1-Metaphase; der Pfeil weist auf das Minichromosom F) Die Probe für die Reverse Transkriptase kann auf Prometaphase-Chromosomen von *B. procumbens* im Centromerbereich lokalisiert werden. Sie detektiert jedoch noch andere Ty3-gypsy-Retrotransposons auf den Chromosomen, die als schwache dispers verteilte Signale entlang der Chromosomarme sichtbar sind.

Die Reverse Transkriptase-Sonde (Abb. 3.36, E) zeigte in PRO1 keine Begrenzung der Hybridisierungsorte auf das Minichromosom. Auch auf allen 18 *B. vulgaris*-Chromosomen, wurden unterschiedlich starke Hybridisierungssignale detektiert. Die Hybridisierungssignale lagen dispers auf den Chromosomen vor.

Die *B. procumbens*-Chromosomen zeichneten sich nach Hybridisierung mit der LTR-Sonde (Abb. 3.36, B) durch Signale in den DAPI-positiven Regionen aus. Mit dem *Beetle2*-LTR wurden nicht alle 18 Chromosomen des Genoms detektiert. Zwei Chromosomen (Pfeile), die kein Hybridisierungssignal zeigten, wurden identifiziert. Zudem fiel die Anzahl der Hybridisierungsorte in den Chromocentren (Fransz *et al.*, 2002) an Interphase-Chromosomen (Abb. 3.36, D) im direkten Vergleich zur Hybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR (Abb. 3.35, D) deutlich geringer aus. Das *Beetle2*-Retrotransposon ist zwar nicht auf allen *B. procumbens*-Chromosomen lokalisiert, jedoch wurde die durch Southern-Hybridisierung (Abb. 3.34) diagnostizierte Wildrübenspezifität für *Beetle2* bestätigt.

Auf den *B. procumbens*-Chromosomen hybridisierte die RT-Sonde überwiegend im Heterochromatin (Abb. 3.36, F). Neben diesen teilweise starken centromerischen Signalen wurden auf allen Chromosomen schwache über das ganze Chromosom verteilte Signale detektiert. Die detektierten Signalintensitäten, unter Verwendung der gleichen Konzentration an DNA-Sonden und Stringenzbedingungen für *Beetle1* und *Beetle2*, fielen in allen Hybridisierungs-Experimenten bei *Beetle2* deutlich schwächer aus.

3.12.3 Detektion von Wildrüben-Chromatin durch die LTRs der *Procumbentes*-spezifischen Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2*

Ziel des folgenden Versuchs war die Detektion von *Beetle1* und *Beetle2* in einer weiteren Fragmentadditionslinie, die ein deutlich kleineres Chromosomenfragment einer Wildrübe der Sektion *Procumbentes* als PRO1 besitzt. Die Mutantenlinie PAT2 enthält ein zusätzliches Chromosomenfragment aus *Beta patellaris*.

FISH mit dem *Beetle1*-LTR (rote Fluoreszenz) an Metaphase- und Interphase-Chromosomen von PAT2 (Abb. 3.37, A, B) detektierten exklusiv das Minichromosom. Der centromerische pTS5-Satellit (grüne Fluoreszenz) wies in der Zweifarben-FISH (Abb. 3.37, A) den gleichen Hybridisierungsort auf. Die ausschließliche Detektion des PAT2-Minichromosoms bestätigte die Eignung des *Beetle1*-Retrotransposons zur Detektion von Wildrübenchromatin und somit zur Analyse der Genomkonstitution verschiedener Hybride, die aus interspezifischen Kreuzungen von *B. vulgaris* und Wildarten aus der Sektion *Procumbentes* resultieren.

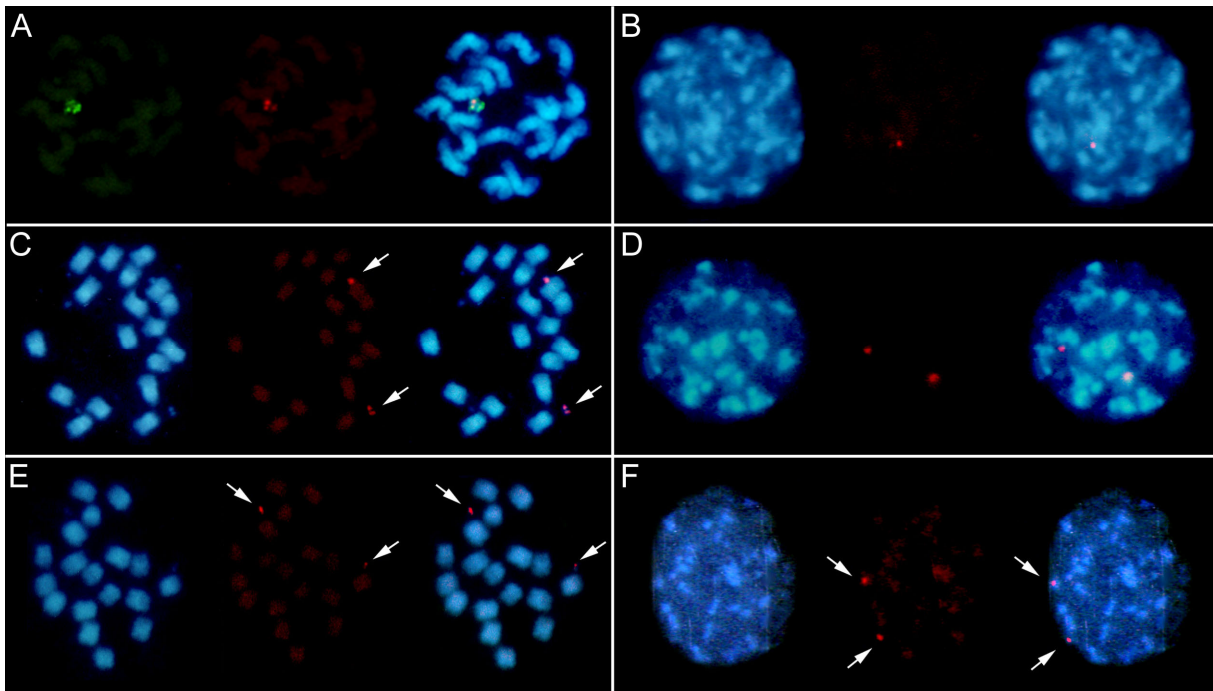


Abb. 3.37: Detektion von Wildrüben-Chromatin durch die LTR-Sequenzen der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2*

Die blaue Fluoreszenz in jeder Teilabbildung zeigt die DAPI-gefärbten Chromosomen. Hybridisierungsorte der markierten DNA-Sonde an homologe Sequenzen auf den Chromosomen wurden mit Biotin-Streptavidin-Cy3 (rote Fluoreszenz) und Dig-Antidigoxigenin-FITC (grüne Fluoreszenz) detektiert. Rechts ist jeweils die digitale Überlagerung beider Abbildungen dargestellt. Durch FISH wurde Wildrüben-Chromatin in einer monosomen Fragmentadditionslinie von *Beta patellaris* (PAT2) und einer disomen Fragmentadditionslinie (PRO1) von *Beta procumbens* durch die *Procumbentes*-spezifischen LTR-Sequenzen der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* Detektion von detektiert. A) Der pTS5-Satellit (grün) und der *Beetle1*-LTR (rot) markieren nach Hybridisierung einer PAT2-Metaphase ausschließlich das Chromosomenfragment aus *B. patellaris*. Das gelbe Fluoreszenzsignal ergibt sich aus der digitalen Überlagerung beider Bilder. B) Der PAT2-Interphasekern zeigt nach Hybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR nur ein definiertes Signal. C) Das in seiner Verbreitung ausschließlich auf die Sektion *Procumbentes* begrenzte *Beetle1*-Element weist in einer mitotischen PRO1-Metaphase zwei Minichromosomen (Pfeile) aus *B. procumbens* unter Verwendung der LTR-Sonde nach. D) Die zwei Hybridisierungsorte des *Beetle1*-LTR an einer PRO1-Interphase belegen den disomen Genotyp der PRO1-Additionslinie aus Abbildung C. E) Zwei Minichromosomen (Pfeile) sind nach der Hybridisierung mit dem *Beetle2*-LTR in einer weiteren PRO1-Metaphase der disomen Linie aus Abbildung C und D detektierbar. F) Die Hybridisierung mit der LTR-Sonde von *Beetle2* an einer Interphase der disomen PRO1-Mutante weist zwei detektierbare Signale (Pfeile) auf.

Im heterologen Hintergrund von *B. vulgaris* wurde in einer PRO1-Chromosomenmutante unter Verwendung des *Beetle1*-LTRs (Abb. 3.37, C und D) und des *Beetle2*-LTRs (Abb. 3.37, E und F) die Anwesenheit von zwei Minichromosomen (Pfeile) nachgewiesen. Der disome Genotyp der analysierten PRO1-Additionslinie besitzt demnach zwei *B. procumbens*-Chromosomenfragmente. Da das Minichromosom in der männlich sterilen PRO1-Linie als Monosom vorliegt wird es in der Meiose nur zu 50 % weitergegeben. Jede Nachkommenschaft besteht nur zur Hälfte aus Pflanzen mit Minichromosom. Daher ist das Vorkommen einer disomen Chromosomenmutante umso erstaunlicher und beruht wahrscheinlich auf einer Störung in der Chromosomenverteilung während der Meiose.

3.13 Genomischer Kontext von Ty3-gypsy-Retrotransposons in BACs aus der Centromer-Region von PRO1

Die Sequenzdaten, die während der Isolation von *Beetle1* aus den PRO1-BACs erzielt wurden, weisen auf eine komplexe Strukturierung von Ty3-gypsy-Retrotransposons in der Centromer-Region von *B. procumbens* hin. Es konnte eine Interspersion von *Beetle1* mit dem centromerischen pTS5-Satelliten dokumentiert und verifiziert werden. Weiterhin wurden verschachtelte Strukturen aufgedeckt, die die Integration von *Beetle1* in andere Ty3-gypsy-Retrotransposons zeigten. Die Existenz deletierter Retrotransposons, die wahrscheinlich aus multiplen Transpositions- und Rekombinationsereignissen hervorgingen, wurde in den Analysen von Ty3-gypsy-Sequenzen bestätigt.

3.13.1 Interspersion des Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* mit dem centromerischen pTS5-Satelliten

Die Analyse von *Beetle1*-Sequenzen auf dem BAC 102A16 zeigte die Integration von *Beetle1* in den pTS5-Satelliten. Dieses Ergebnis wurde mit dem PCR-Contig (Abb. 3.4), das überspannend eine in ein pTS5-Array integrierte *Beetle1*-Kopie abdeckt und den daraus resultierenden Produkten aus dem BAC 125N12 (Abb. 3.5) verifiziert.

Die Integration in den pTS5-Satellitenblock wurde zusätzlich durch die Primerkombination pTS5 for/*Beetle1*_PBS rev für den 5'-LTR und pTS5 rev/*Beetle1*_PPT for für den 3'-LTR (Abb. 3.38, A) bestätigt und zeigte für eine definierte *Beetle1*-Kopie auf dem BAC 125N12 eine TSD aus den acht Nukleotiden 5'-TGAACACC-3' (Tab. 3.9).

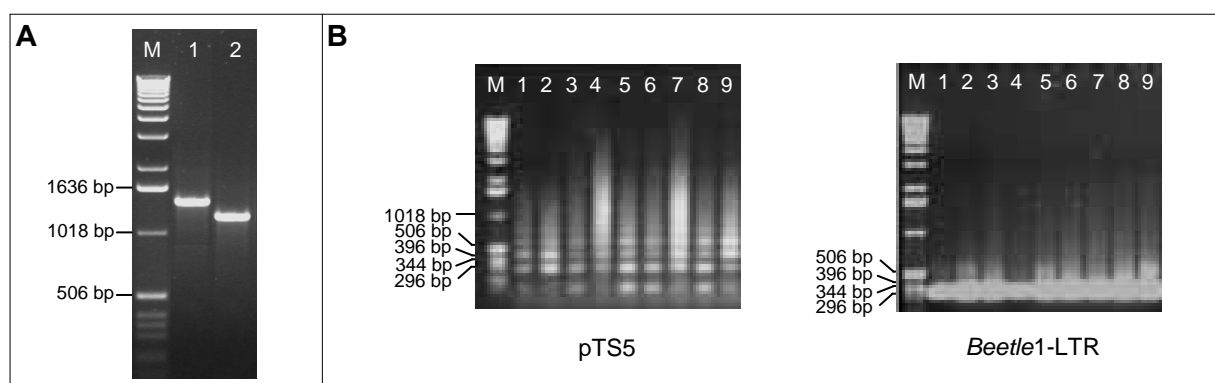


Abb. 3.38: Interspersion von *Beetle1* mit dem centromerischen Satellitenrepeat pTS5

A) Das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel zeigt spezifische PCR-Amplifikate nach Einsatz der Primerkombination pTS5/*Beetle1*_PBS rev (1) und pTS5 rev/*Beetle1*_PPT for (2) bei Verwendung des BACs 125N12 als Template. B) Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten aus der pTS5-spezifischen Primerkombination pTS5 for/pTS5 rev (1) und der für den *Beetle1*-LTR charakteristischen Primerkombination *Beetle1*_LTR for/rev (2). Als Template dienten die PRO1-BACs 50C18 (1), 51N23 (2), 86O2 (3), 92G20 (4), 102A16 (5), 104N4 (6), 110G22 (7), 124I17 (8) und 125N12 (9).

Die Interspersion zwischen Satellit und Ty3-gypsy-Retrotransposon führte dazu alle pTS5-positiven PRO1-BACS auf die Anwesenheit von *Beetle1*-Sequenzen zu überprüfen. In der PCR mit den neun BACs der Klasse I aus der Core-Region des Minichromosoms (Tab. 3.1) entstand unter Verwendung von pTS5-Primern ein charakteristisches Bandenmuster (Abb. 3.38, B). Die tandemartige Anordnung der pTS5-Satelliteneinheiten resultiert in der Amplifikation von Monomeren, Dimeren und höheren Satelliteneinheiten, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu einem typischen Leitemuster führt. Die PCR-Analyse mit LTR-Primern von *Beetle1* zeigte ausnahmslos in allen neun BACs ein Produkt in der erwarteten Größe von 346 bp (Abb. 3.38, B).

Im Pulsfeldgel aufgetrennte *Hind*III-restringierte BACs der Klasse I dienten der vertieften Untersuchung der pTS5- und *Beetle1*-Sequenzen. Sowohl aus der Hybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR (Abb. 3.39, A), als auch der Hybridisierung mit dem pTS5-Satelliten (Abb. 3.39 B) ergab sich ein komplexes Bandenmuster mit Signalen in einem Größenbereich von 7 kb bis zu 85 kb. Sechs von neun BACs (BAC 86O2, 92G20, 102A16, 104N4, 110G22, 124I17; Spuren 3-8) zeigten in beiden Hybridisierungen ein identisches Hybridisierungsmuster, was die Interspersion von *Beetle1* und pTS5 bestätigt. Mit 80 % übereinstimmenden Banden gab es kaum pTS5-Arrays ohne *Beetle1*.

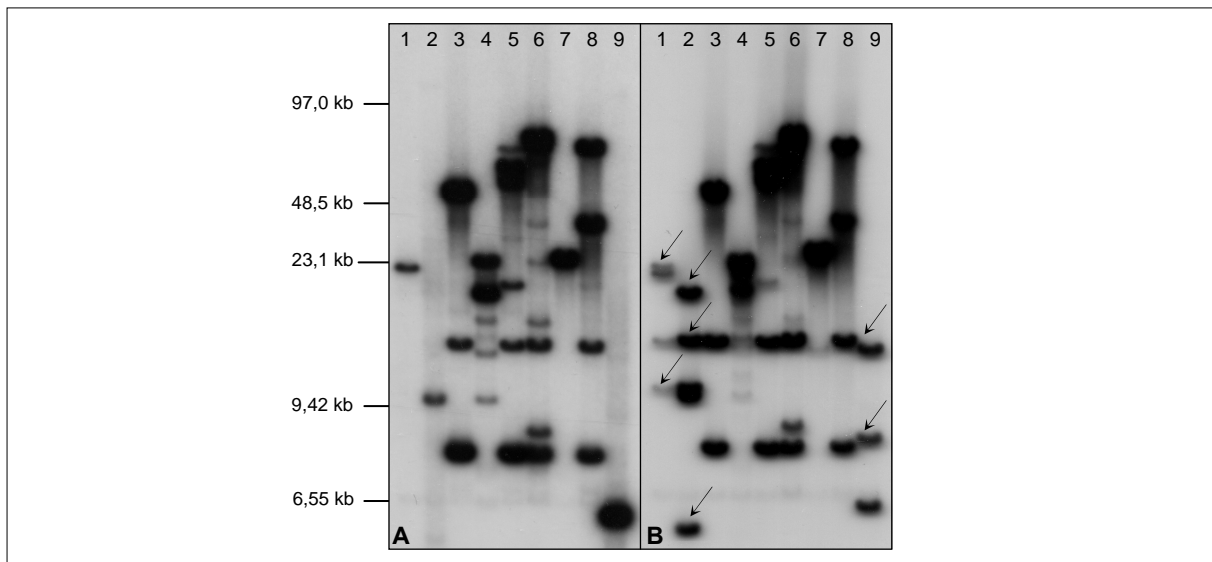


Abb. 3.39: BAC-Fingerprints mit dem *Beetle1*-LTR und dem pTS5-Satellitenrepeat

Southern-Analyse mit im Pulsfeldgel aufgetrennter restringierter BAC-DNA. A) Southern-Filter nach Hybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR. B) Das Hybridisierungsmuster der BAC-DNA nach Hybridisierung mit dem Satellitenrepeat pTS5 weist die gleichen Signale auf, wie nach der Hybridisierung mit der LTR-Sonde aus *Beetle1*. Mit der pTS5-Sonde wurden jedoch zusätzliche Restriktionsfragmente (Pfeile) detektiert. Die BAC-Klone wurden mit *Hind*III restringiert und in folgender Reihenfolge aufgetragen: 50C18 (1), 51N23 (2), 86O2 (3), 92G20 (4), 102A16 (5), 104N4 (6), 110G22 (7), 124I17 (8) und 125N12 (9).

Drei BACs (50C18, 51N23 und 125N12; Spur 1, 2 und 9; Pfeile) wiesen mit der pTS5-Sonde Banden auf, die nicht mit dem *Beetle1*-LTR detektiert werden konnten. Diese Restriktionsfragmente, die durchaus Größen bis zu 20 kb aufweisen, sind vermutlich in großen zusammenhängenden Satellitenblöcken organisiert.

3.13.2 Integration von *Beetle1* in Sequenzen von Ty3-gypsy-Retrotransposons

Da die Retrotransposition von LTR-Retrotransposons mit einer möglichen Insertion in Gene und somit potentiellen mutagen Effekten verknüpft ist, stellt die verschachtelte Integration in andere vorhandene Retrotransposon-Kopien vermutlich eine Maßnahme zur Verringerung negativer Transpositionseffekte dar.

3.13.2.1 Integration von *Beetle1* in das Ty3-gypsy-Retrotransposon *Beetle2*

Wie bereits ausführlich beschrieben erfolgte die Isolation von *Beetle1* aus dem BAC 125N12 durch die Subklonierung eines *Bam*HI-Fragments, das in seiner Größe ein vollständiges Ty3-gypsy-Retrotransposon enthalten konnte. Durch die Sequenzauswertung der Subklone konnte die Integration von *Beetle1* in ein anderes Ty3-gypsy-Retrotransposon, das nicht zu *Beetle1* homolog ist, ermittelt werden (Abb. 3.15). Die Transposition von *Beetle1* erfolgte in revers-komplementärer Orientierung in die Protease-Region (Pos. 3350) von *Beetle2* (Abb. A2). Eine Zielsequenz-Verdoppelung von fünf Nukleotiden mit der Abfolge 5'-CCATC-3' konnte direkt vor dem 5'-LTR und nach dem 3'-LTR von *Beetle1* bestimmt werden.

Die rearrangierte Struktur von *Beetle1* und *Beetle2* auf dem BAC 125N12 wurde durch *Long Range*-PCR verifiziert (Abb. 3.40). Hierbei wurde mit den Primern *Beetle2*_ PPT rev und *Beetle2*_PBS for (Abb. 3.40, A 1) über die gesamte *Beetle1*-Kopie hinweg amplifiziert. Das daraus resultierende Amplikon war 11 882 bp groß (Abb. 3.40, B Spur 1). Die in Abbildung 3.40, A aufgeführten Kombinationen aus *Beetle1*- und *Beetle2*-spezifischen Primern bestätigten die Interspersion beider *Beetle*-Elemente.

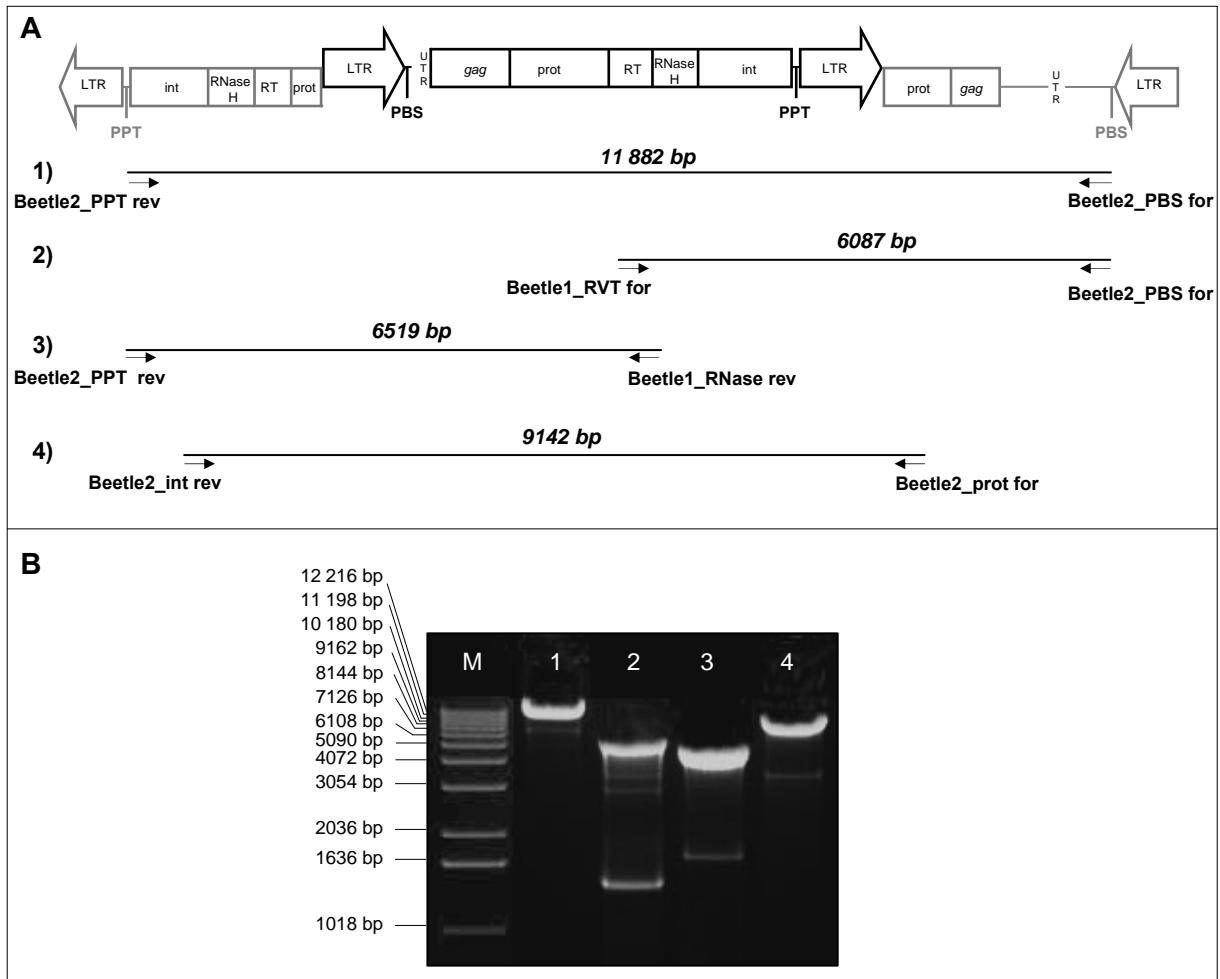


Abb. 3.40: Nachweis der Integration von *Beetle1* in *Beetle2* durch PCR

A) Position und Bezeichnung der verwendeten Primerpaare (1-4), die eine Amplifikation definierter Abschnitte aus dem rearrangierten Bereich zwischen *Beetle1* und *Beetle2* ermöglichen. Die erwartete Produktgröße der einzelnen Primerkombinationen ist kursiv über dem amplifizierten Sequenzabschnitt (Linie) angegeben. B) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den Amplifikaten der Primerpaare 1-4. Als Template diente DNA vom BAC125N12.

Ein weiterer Beleg für die Transposition von *Beetle1* in *Beetle2* ergab sich aus der Auswertung der BAC-Endsequenzen. Die 537 bp lange T7-Endsequenz aus dem BAC 127H9 umfasst 221 bp aus dem 5'-Bereich eines 5'-LTRs einer *Beetle1*-Kopie. Stromaufwärts von dieser LTR-Sequenz befinden sich Sequenzen aus der Protease-Region von Ty3-gypsy-Retrotransposons, die eine Homologie von 91,6 % mit *Beetle2* aufweisen. Die Integration dieser *Beetle1*-Kopie in ein Mitglied der *Beetle2*-Familie erfolgte ebenfalls in revers-komplementärer Orientierung. Handelt es sich hierbei ebenso um die Transposition einer *Beetle1*-Kopie in die Protease-Region einer *Beetle2*-Kopie, so ist dieser Integrationsort an Basenpaarposition 3388 unterschiedlich zu dem im BAC 125N12 identifizierten Integrationsort an Position 3350.

3.13.2.2 Integration von *Beetle1* in Mitglieder der *Beetle1*-Familie

Durch inverse PCR-Analysen mit genomischer DNA aus *B. procumbens* wurde festgestellt, dass *Beetle1* in andere Kopien der Kopien der *Beetle1*-Familie transponiert. Unter Einsatz von Primern aus dem *Beetle1*-LTR wurden in *Hind*III-restringierter DNA vorwiegend *Beetle1*-flankierende Sequenzen ermittelt, die stromabwärts des 3'-LTRs lagen (Abb. 3.7). Dabei wurde die Integration in die UTR und den 3'-Bereich der *gag*-Region von *Beetle1* nachgewiesen. PCR-Amplifikationen sowohl mit genomischer DNA von *B. procumbens* als auch BAC-DNA untermauerten diesen Befund. Unter Verwendung der Primer Beetle1_PPT for und Beetle1_gag rev wurden Sequenzen amplifiziert, in denen die Transposition in Position 1269 (*Beetle1*-UTR) und in Position 1565 (*gag*-Region) von *Beetle1* erfolgte (Tab. 3.9). In beiden Fällen wurde keine PBS identifiziert.

Die PCR mit den Primern iPCRbeetle for/rev, welche der Charakterisierung der KlasseI-BACs in Bezug auf vollständige *Beetle1*-Kopien dienen sollte, offenbarte die Existenz rekombinanter *Beetle1*-Sequenzen. Das erwartete Amplikon von 5209 bp Länge wurde im BAC 110G22 detektiert (Abb. 3.41, A Spur 1). Aus dieser PCR resultierte aus dem BAC 125N12 mit 1330 bp ein deutlich kleineres Produkt (Abb. 3.41, A Spur 2).

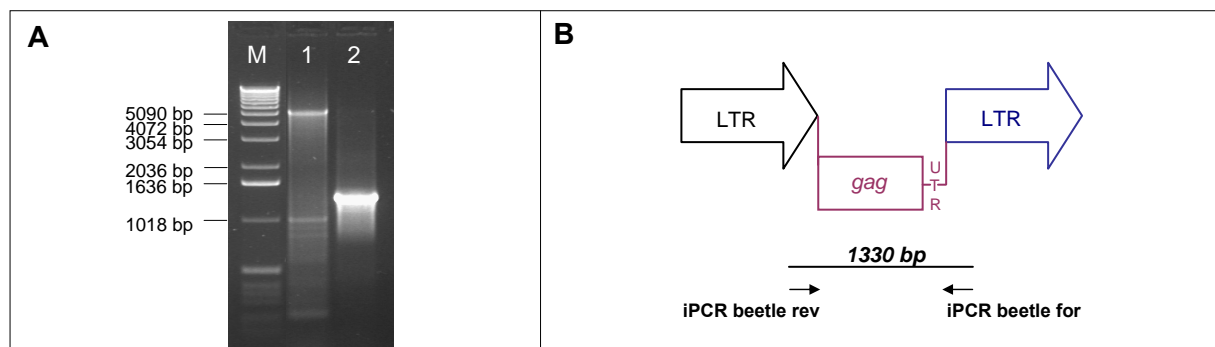


Abb. 3.41: Nachweis der *Beetle1*-Integration in Mitglieder der *Beetle1*-Familie

A) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der entstandenen Amplikons unter Einsatz der Primer iPCR beetle for/rev aus den BACs 110G22 (1) und 125N12 (2). B) Darstellung der Sequenzstruktur des Amplikons aus dem BAC 125N12 (B; Spur 2).

Nach der Sequenzanalyse stellte sich dieses kleinere Amplikon als *Beetle1*-Fragment zwischen zwei LTRs heraus (Abb. 3.41, B). Auch hier war vor der UTR keine PBS-Sequenz aufzufinden. Zudem lag der im 3'-Bereich der Sequenz gelegene LTR (Abb. 3.41, B blau) in 5'→3'-Orientierung zur stromaufwärts in anderer Orientierung liegenden UTR-*gag*-Sequenz vor und konnte nicht dem internen *Beetle1*-Fragment (Abb. 3.41, B rot) zugeordnet werden. Deshalb handelt es sich nicht um eine *Beetle1*-Kopie deren PBS deletiert ist, sondern um zwei rearrangierte *Beetle1*-Fragmente, die stromabwärts eines 3'-LTR von *Beetle1* (Abb. 3.41, B schwarz) liegen.

Um die Frage zu klären, ob sich dem 5'-und/oder 3'-Bereich der 1330 bp-Sequenz eine komplette *Beetle1*-Kopie anschließt, wurden mehrere Kombinationen verschiedener *Beetle1*-Primer getestet. Die Kombination aus den Primern *Beetle1_PBS for/Beetle1_gag for* führte zur Amplifikation ab der PBS einer vermutlich kompletten *Beetle1*-Kopie in die *gag*-Region der identifizierten rearrangierten Struktur (Abb. 3.42).

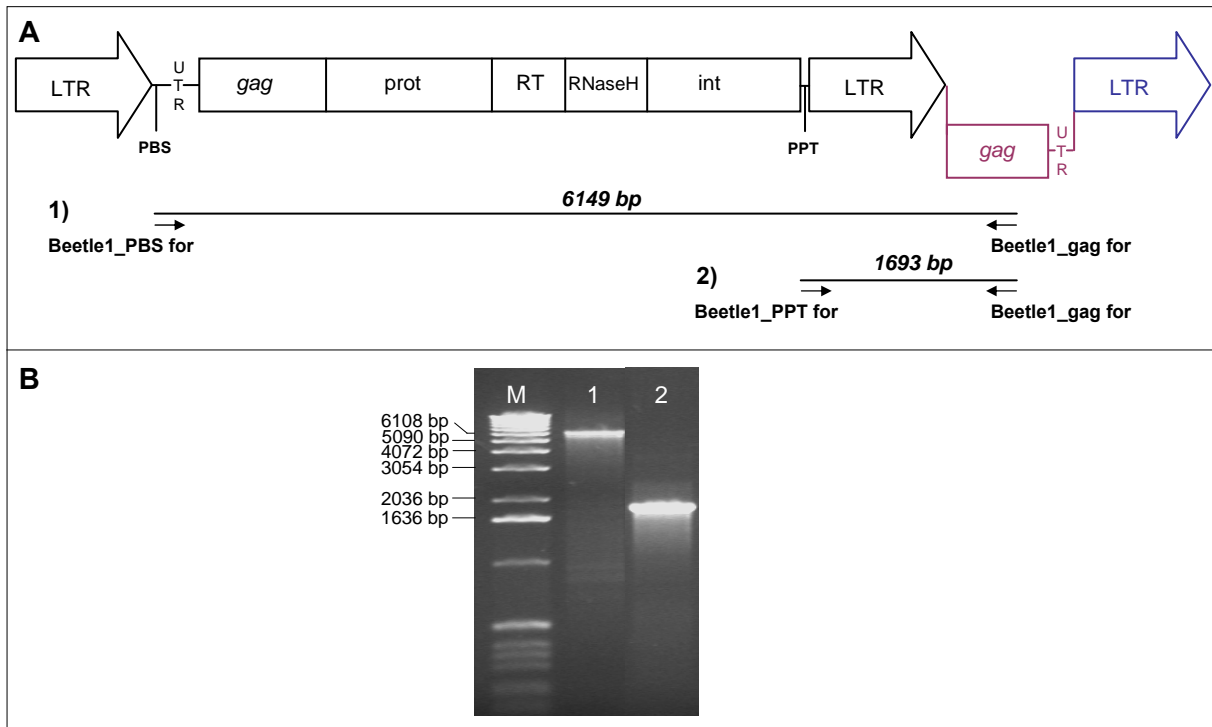


Abb. 3.42: Rearrangierte *Beetle1*-Sequenzen

A) Schematische Darstellung der auf dem BAC 125N12 diagnostizierten rearrangierten *Beetle1*-Struktur. Die Lage der verwendeten Primer ist an der Gesamtstruktur skizziert; die Produktgröße ist kursiv über dem Amplikon angegeben. B) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den aus den Primerkombination *Beetle1_PBS for/Beetle1_gag for* (1) und *Beetle1_PPT for/Beetle1_gag for* (2) entstanden PCR-Produkten aus dem BAC 125N12.

Die Untersuchung von Sequenzen der *Beetle1*-Familie lieferte Daten über die Integrationsorte des Ty3-*gypsy*-Retrotransposons. Es konnte die Integration in das Satellitenrepeat pTS5 und in die Ty3-*gypsy*-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* nachgewiesen werden. So konnte allein im BAC 125N12 die Transposition von *Beetle1* sowohl in den pTS5-Satelliten (Abb. 3.4; 3.5) als auch in *Beetle2* (Abb. 3.15) und *Beetle1* (Abb. 3.42) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich vermutlich jeweils um vollständige *Beetle1*-Kopien. Das Vorkommen einer vollständigen *Beetle1*-Kopie konnte bisher nur für die Integration in *Beetle2* (Abb. 3.40) verifiziert werden.

Die Länge der ermittelten TSDs zeigte Differenzen, die in Tabelle 3. 10 zusammengefasst sind. Es wurde aus der einen Seite für die Transposition in den pTS5-Satelliten und in *Beetle2* eine TSD-Länge von fünf Basenpaaren festgestellt. Auf der anderen Seite wurde auch eine

Zeilsequenzverdopplung von acht Basenpaaren identifiziert, die aus der Integration von *Beetle1* in das Satellitenrepeat pTS5 entstand. Desweiteren wurden *Beetle1*-flankierende Sequenzen untersucht, die aus der Analyse von stromaufwärts oder stromabwärts von *Beetle1*-Kopien liegenden Sequenzbereichen resultierten und nicht als vollständige TSD bezeichnet werden können. Ein Bereich von fünf bis acht Basenpaaren wurde dabei betrachtet, da dieser Größenbereich für Integration von *Beetle1* typisch zu sein scheint.

Die Auswertung der gesammelten Sequenzdaten lässt bei der Transposition von *Beetle1* auf eine Präferenz für bestimmte repetitive Sequenzen, aufgrund der divergenten TSDs jedoch nicht für spezifische Nukleotidsequenzen, schließen.

Tab. 3.10: Integrationsorte von Mitgliedern der *Beetle1*-Familie, die Sequenz der Target-Site-Duplikation (TSD) und deren Nukleotidposition

Integrationsort	Target-Site-Duplikation	Position der Integration	Bemerkungen ^{c)}
pTS5-Satellit	TGAACACC	60	komplette TSD einer vollständigen <i>Beetle1</i> -Kopie des BACs 125N12 3'→5'-Orientierung des Satellitenrepeats
	(TAT)GAGTT ^{a)}	151	5'→3'-Orientierung des Satellitenrepeats
	(TGA)ACACC ^{a)}	60	3'→5'-Orientierung des Satellitenrepeats
	(AT)TCAAG ^{a)}	40	5'→3'-Orientierung des Satellitenrepeats
	GTCTC	36	komplette TSD eines Solo-LTRs integriert in 3'→5' orientierte pTS5- Satellitenrepeats
<i>Beetle1</i>	(CAT)ACACT ^{a)}	1389	Integration in <i>Beetle1-gag</i> 3'→5'-Orientierung des Ty3-gypsy-Retrotransposons
	(AAA)ATGAG ^{a)}	1269	Integration in <i>Beetle1</i> -UTR 5'→3'-Orientierung des Ty3-gypsy-Retrotransposons
	(CAG)AATTT ^{a)}	1565	Integration in <i>Beetle1-gag</i> 5'→3'-Orientierung des Ty3-gypsy-Retrotransposons
<i>Beetle2</i>	CCATC	3350	komplette TSD vom vollständigen <i>Beetle1</i> des BACs 125N12; Integration in <i>Beetle2</i> -Protease 3'→5'-Orientierung des Ty3-gypsy-Retrotransposons
	(AAT)AGCT ^{b)}	3388	Integration in <i>Beetle2</i> -Protease 3'→5'-Orientierung des Ty3-gypsy-Retrotransposons

a) keine komplette TSD ermittelt; Sequenz stellt den Integrationsort von *Beetle1* nach dem 3'-LTR dar

b) keine komplette TSD ermittelt; Sequenz stellt den Integrationsort von *Beetle1* nach dem 3'-LTR dar

c) die *Beetle1*-Sequenz wurde in 5'→3'-Orientierung untersucht; dementsprechend ist die Orientierung der Sequenzen, in die die Integration erfolgte, vermerkt

3.13.3 Deletionen innerhalb des *gag-pol*-Polyproteins von *Beetle1*

Bei der Analyse von BACs der Klasse I wurden *Beetle1*-Derivate identifiziert, die interne Deletionen innerhalb des *gag-pol*-Polyproteins aufwiesen. Dieses Phänomen zeigte sich erstmalig bei der Amplifikation der durch die LTR-Sequenzen eingerahmten

Retrotransposon-Strukturen unter Verwendung der PBS/PPT-Primer mit BAC-DNA aus dem BAC 51N23 (Abb. 3.39, B; Spur 2). Durch weitere Primerkombinationen, wie Beetle1_PBS for/Beetle1_RNase rev (Abb. 3.43, A; b) und Beetle1_RVT for/Beetle1_PPT rev (Abb. 3.43, A; c) wurde die Region der Deletion eingegrenzt. Die resultierenden PCR-Produkte (Abb. 3.43, B) deuteten auf Deletionen innerhalb der RNaseH- und Integrase-Region.

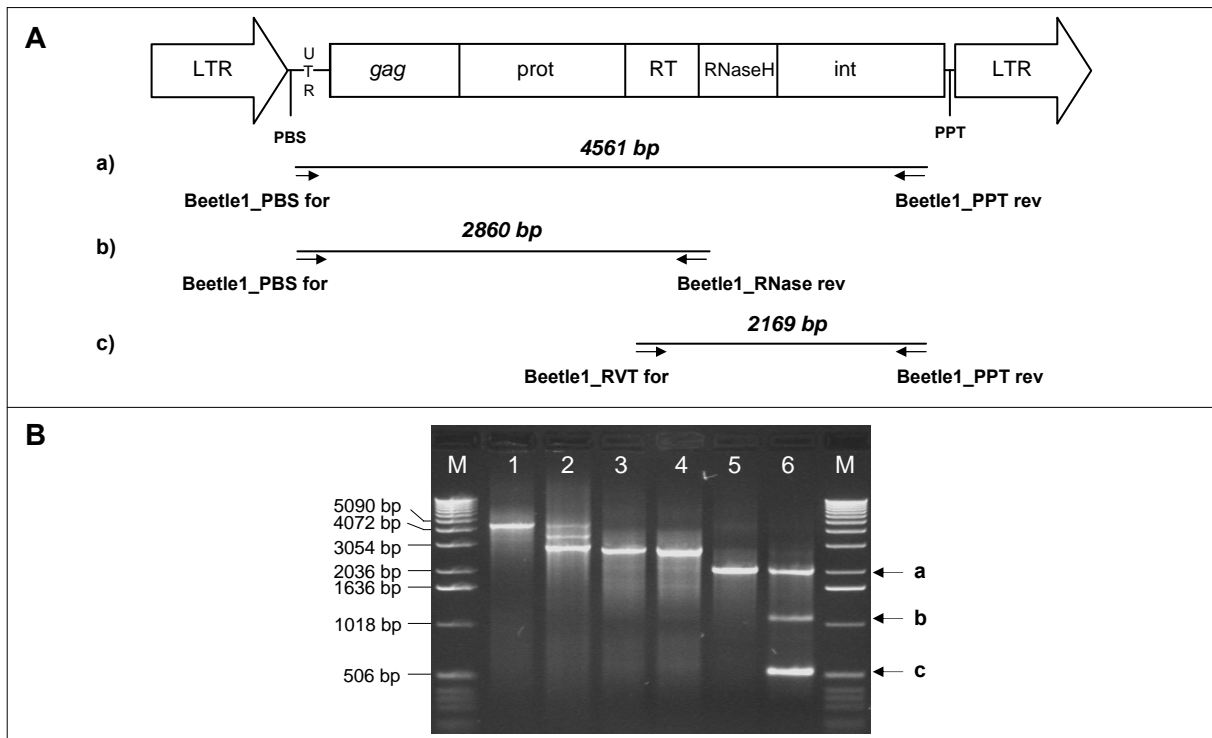


Abb. 3.43: Nachweis von *Beetle1*-Elementen mit Deletionen innerhalb des *gag-pol*-Polyproteins

A) Das Schema zeigt die Position der zur Amplifikation der *gag-pol*-Bereiche verwendeten Primerpaare (a-c) zur Struktur von *Beetle1*. Die erwartete Produktgröße ist kursiv über dem amplifizierten Sequenzabschnitt (Linie) angegeben. Die Orientierung der Primer in 5'→3'-Richtung ist durch einen Pfeil dargestellt. B) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den Amplikons der Primerpaare a (Spuren 1, 2), b (Spuren 3, 4) und c (Spuren 5, 6). Dabei wurde in der Spur 6 ein undeletiertes Amplikon (Pfeil a) und zwei Amplikons mit internen Deletionen (Pfeil b, Pfeil c) detektiert. Als Template diente DNA vom BAC 125N12 (Spuren 1, 3 und 5) und BAC 51N23 (Spuren 2, 4 und 6).

Die Klonierung der intakten Polyproteinsequenz zwischen den Primern Beetle1_RVT for und Beetle1_PPT rev (Abb. 3.43, B, Spur 6, Pfeil a) und dem deutlich kleineren Amplikon mit deletierten *pol*-Sequenzen aus dem BAC 51N23 (Abb. 3.43, B, Spur 6, Pfeil c) sollte Aussagen über den deletierten Sequenzbereich ermöglichen. Der 2166 bp umfassende Abschnitt des *gag-pol*-Polyproteins der vollständigen *Beetle1*-Kopie des BACs 51N23 wies im Vergleich mit *Beetle1* aus dem BAC 125N12 ein internes Stopcodon (Position 1144-1146) auf. Mit einer Größe von 594 bp zeigte sich die deletierte *Beetle1*-Sequenz (*Beetle1*Δ) um 1572 Basenpaare verkürzt (Abb. 3.44). Weiterhin konnte mit den Nukleotiden 5'-AAGGT-3' eine fünf Basenpaar umfassende kurze Sequenzwiederholung identifiziert werden, die die Deletion von beiden Seiten flankiert.

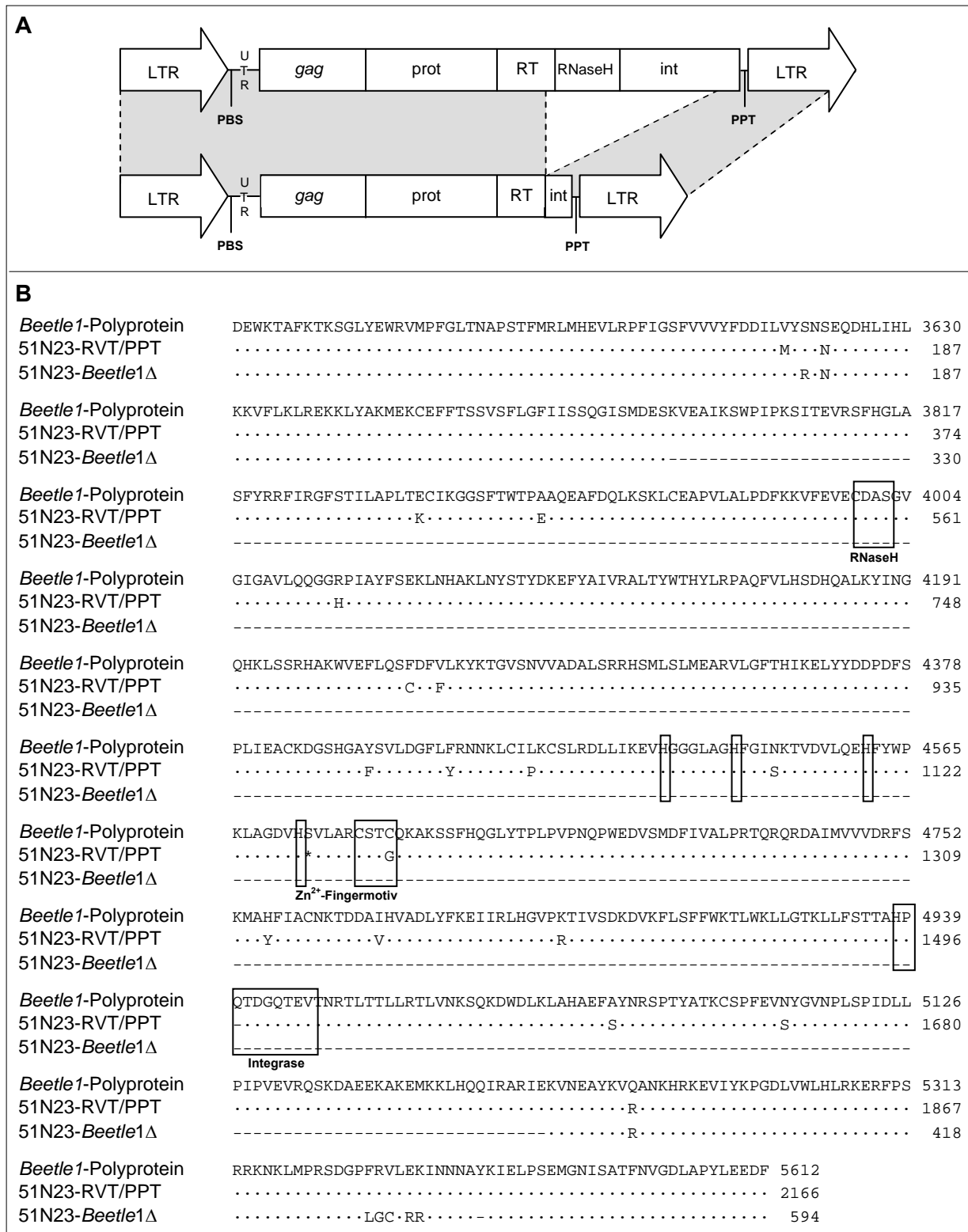


Abb. 3.44: Graphische Darstellung und Sequenzanalyse der im *gag-pol*-Polyprotein deletierten *Beetle1*-Sequenz

A) Graphische Darstellung der deletierten *Beetle1*-Kopie des BACs 51N23 im Vergleich zum intakten *Beetle1*-Element des BACs 125N12 B) Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus dem undeletierten und deletierten *Beetle1*-Abschnitt des BACs 51N23 zu der Aminosäureabfolge der vollständigen *Beetle1*-Kopie aus dem BAC 125N12. Die PCR-Amplikons liegen im *gag-pol*-Polyprotein zwischen der Reversen Transkriptase und dem Polypurintrakt (PPT). Homologe Bereiche sind durch Punkte und fehlende Sequenzbereiche durch Striche dargestellt. Die konservierten Domänen innerhalb des Polyproteins sind schwarz umrandet.

3.13.4 Verteilung von *Beetle1* und *Beetle2* in BACs aus der Centromer-Region von PRO1

Aus der Southern-Hybridisierung der kompletten BAC-Bank mit den centromerischen Satelliten pTS5 und pTS4.1 resultierten 121 PRO1-BACs. Diese wurden den Klassen I-IV zugeordnet, wobei nur die Klassen I-III für die Centromer-Region von *B. procumbens* relevant sind.

Dot Blots von 96 dieser BACs, die die Klassen I-III vollständig umfassen, mit LTR-Sonden für *Beetle1* und *Beetle2* und sich anschließende PCR-Analysen der Dot-Blot-positiven BACs mit LTR-Primern zeigten neben dem abundanten Vorkommen beider LTR-Sequenzen (Abb. 3.45, B; 3.45, C; Abb. 3.46, B, 3.46, C) auch die Präsenz deletierter Retrotransposons.

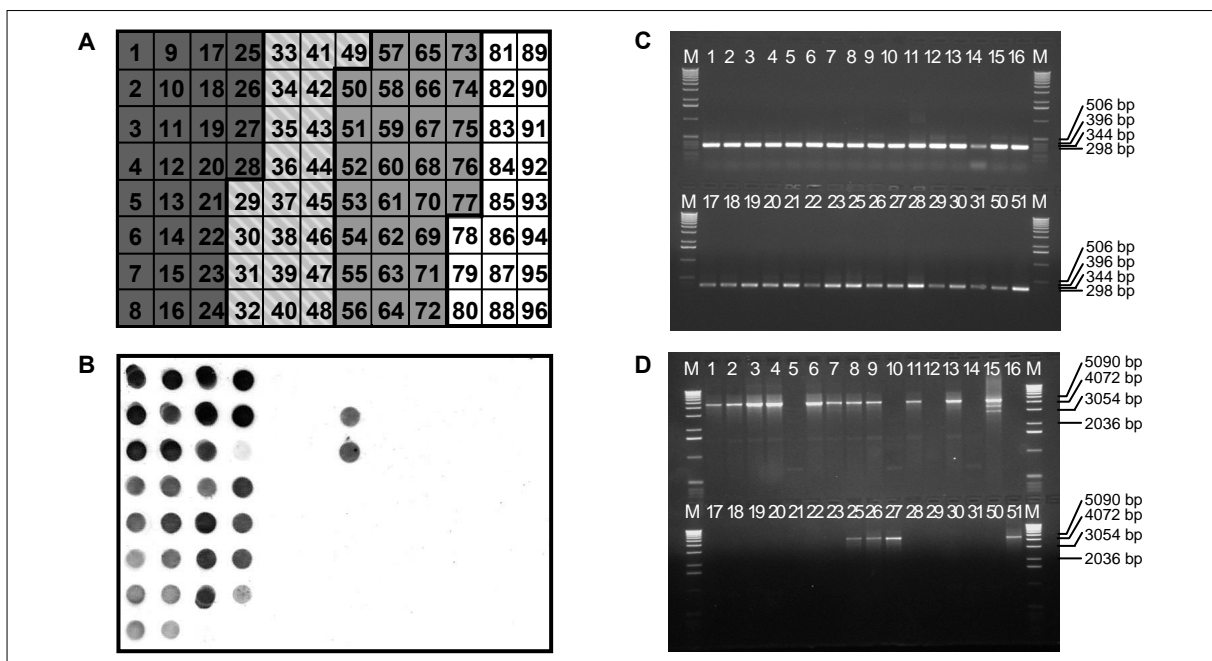


Abb. 3.45: PCR-Analysen *Beetle1*-LTR positiver PRO1-BACs

A) Schema und Nummer der aufgetragenen BAC-Klone, sowie deren Klassifizierung in die einzelnen Bereiche des PRO1-Minichromosoms (Klasse I-IV). B) Hybridisierungsmuster der PRO1-BACs nach Hybridisierung mit einer Sonde aus dem *Beetle1*-LTR. C) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den Amplikons der aus den Dot-Blot-Analysen selektierten PRO1-BACs unter Verwendung von *Beetle1*-LTR spezifischen Primern. D) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten der selektierten BACs nach Amplifikation der *gag-pol*-Region (*Beetle1*_PBS for/*Beetle1*_PPT rev).

32 BACs aus den Klassen I-III enthalten den *Beetle1*-LTR. Sehr hoch ist der Anteil in Klasse I (96 %). Die Amplifikation der internen Retrotransposon-Domänen mit der Kombination aus PBS- und PPT-Primer offenbarte die rearrangierte Struktur von *Beetle1*-Retrotransposons. Nur 15 der 32 mit dem *Beetle1*-LTR positiven BACs zeigten ein Amplikon der *gag-pol*-Region (Abb. 3.45, D). Das Auftreten von drei verschieden großen Amplikons im BACs 51N23 (Spur 15) nach PCR mit den PBS/PPT-Primern für *Beetle1* (Abb. 3.45, D)

deutet auf zwei *Beetle1*-Kopien, die internen Deletionen aufweisen. Eine der deletierten *Beetle1*-Kopien (*Beetle1* Δ) wurde im vorherigen Abschnitt bereits ausführlich beschrieben (Abb. 3.43; Abb. 3.44).

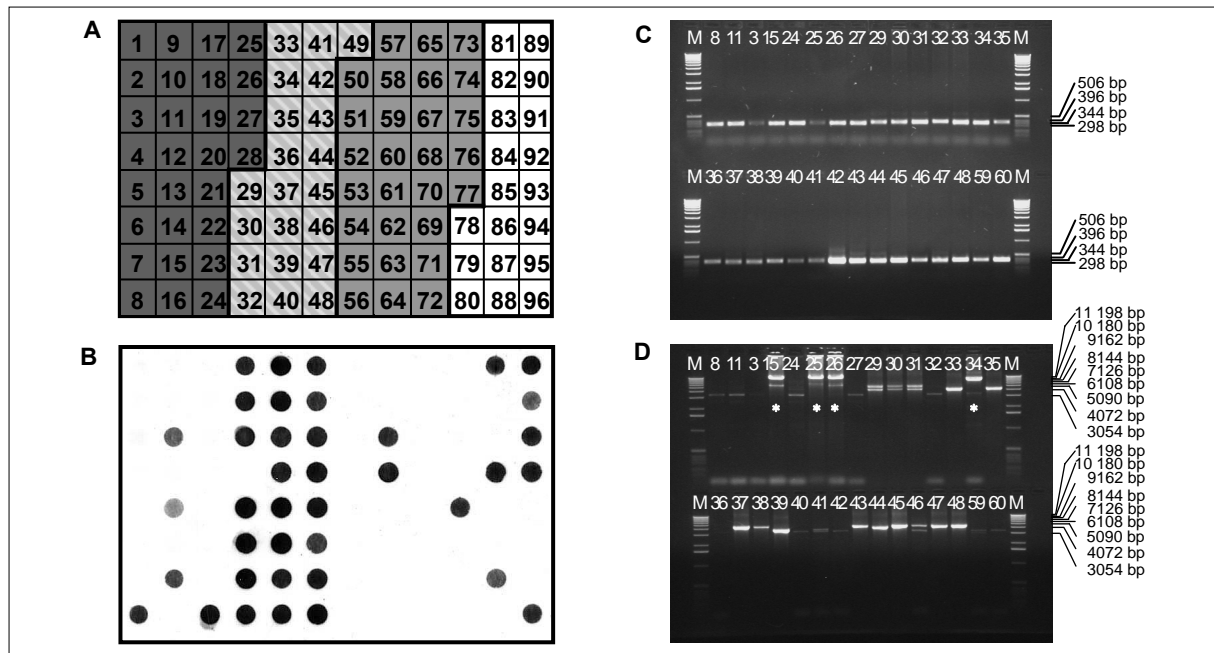


Abb. 3.46: PCR-Analysen *Beetle2*-LTR positiver PRO1-BACs

A) Schema und Nummer der aufgetragenen BAC-Klone, sowie deren Klassifizierung in die einzelnen Bereiche des PRO1-Minichromosoms (Klasse I-IV). B) Hybridisierungsmuster der PRO1-BACs nach Hybridisierung mit einer Sonde aus dem *Beetle2*-LTR. C) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den Amplifikons der aus den Dot-Blot-Analysen selektierten PRO1-BACs unter Verwendung von *Beetle2*-LTR spezifischen Primern. D) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten der selektierten BACs nach Amplifikation der *gag-pol*-Region (*Beetle2_PBS* for/*Beetle2_PPT* rev). BAC-Klone, deren Amplifikons die Integration von *Beetle1* in *Beetle2* darstellen, sind mit einem Sternchen markiert.

Die 30 mit dem *Beetle2*-LTR positiven BACs sind hauptsächlich in die Klasse II eingeordnet (Abb. 3. 46), die sich durch die Anwesenheit der beiden Satellitenrepeats pTS5 und pTS4.1 definiert. Lediglich 17,8 % der Klasse I-BACs enthalten den *Beetle2*-LTR, dafür sind mit 95 % mit einer Ausnahme alle BACs der Klasse II mit dem LTR von *Beetle2* positiv. Die PCR mit den *Beetle2*-Primern für PBS und PPT zeigte in diesen BACs drei unterschiedliche Amplifikons. Zum einen war die Region zwischen Primerbindestelle und Polypurintrakt einer intakten *Beetle2*-Kopie mit einer Größe von 5137 bp in 10 BACs nachweisbar (Abb. 3. 46, D, Nummern 43-48). Zum anderen wurden *Beetle2*-Kopien ermittelt, die interne Deletionen aufweisen (Nummern 33, 35, 37, 38). Auffällig dabei war, basierend auf der Produktgröße, das gleichzeitige Vorkommen von vermutlich vollständigen *Beetle2*-Retrotransposons und deletierten Derivaten in mehreren BACs (z. B. Nummer 29-31).

Die Analyse der centromerischen PRO1-BACs zeigte, dass die *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen überwiegend deletiert vorliegen.

3.13.4 Existenz weiterer Ty3-gypsy-Sequenzen in BACs aus der Centromer-Region von PRO1

Die Auswertung von BAC-Endsequenzen führte weiterhin zur Identifizierung von Ty3-gypsy-Retrotransposon-Sequenzen, die in ihrer Homologie von den *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen abwichen. Die am T7-Ende liegende DNA-Sequenz des BACs 125N12 konnte in die Protease-Region des *gag-pol*-Polyproteins von Ty3-gypsy-Retrotransposons eingeordnet werden. Die Homologie zum entsprechenden Sequenzabschnitt von *Beetle1* bzw. *Beetle2* betrug auf Proteinebene nur 34,8 % bzw. 47,5 %, weshalb es sich wahrscheinlich um eine andere Familie von Ty3-gypsy-Retrotransposons handelt.

Mit höheren Homologien zu den *Beetle*-Elementen ließ sich die SP6-Endsequenz des BACs 97B8 ebenfalls der Protease-Region zuordnen. Hier lagen die Werte auf Proteinebene bei 64,6 % für den paarweisen Vergleich mit *Beetle1* und bei 46,3 % für den Abgleich mit der entsprechenden *Beetle2*-Region. In Abbildung 3.47 ist der Homologievergleich der übereinstimmenden Sequenzbereiche aus den BAC-Endsequenzen mit den entsprechenden Sequenzen aus *Beetle1* und *Beetle2* dargestellt.

<i>Beetle1</i>	NDKVLCDVVPNNACHILLGRPWQSDKETLHNGRTNTYTFMHEN-RKTLSPSKKGPNDPKKETS--NSK-AKNOKSL	548
<i>Beetle2</i>	KDELWGDVLPMSACHVLLGRPLQFDRKIIHEGETNVYSVLMSG-KRIRLMPLSPNTIAPKKRDE-----SKQSL	356
125N12-T7	EDERWCDILPMDACHLLGRPWQFDHSEHKKSNNVLTTKDGRKVKLLPLPP---KVAKKDK-----EKSNY	66
97B8-SP6	-----QSDKDTVHNGRTNTYSEKHNQ-KKTVLSPGKENTNFTKKNQSPPNPKNTKNKKTL	55
<i>Beetle1</i>	ILQKHQVDKATEKGKEMYLLLLFAAN-DENTRELHDWVKPLVNDFSDLFPEDLPYGLPPSRGIEHQIDLVPGAPLPN	623
<i>Beetle2</i>	FLSPKEFEKEVEVEGHGYVLFVKCTLTNDVSMKD-PNLAALLEFGDVFPKELPQGLPPLRGIEHAIDLVPGAPLPN	431
125N12-T7	LVSCNEFVKIIEENGCGYALVVRTKDENEITCNSPLLDLEEFKDVFPNDLPKGLPPIRGIEHAIDLIPGSPLPN	143
97B8-SP6	FLSQNOVVKAVEKGKIMYFLLLVTEN-DVHTRDIPDLVKPLIKEYSDFPKDLPSGLPSIKGIEHQIDLIPGAPLPN	130
<i>Beetle1</i>	KAAYRCNPEEAKELQKITELLAKGFVOESL	654
<i>Beetle2</i>	KPAYRCNPMASKELQITIEELIERGVKCEM	462
125N12-T7	KAAYRCNPEESKE-----	156
97B8-SP6	KAAYRCNPEEAKELQKITGELLSIGFVQEV	161

Abb. 3.47: Homologievergleich abgeleiteter Aminosäuresequenzen aus der Protease-Region von Ty3-gypsy-Retrotransposons

Die für den Aminosäurevergleich verwendeten Sequenzen stammen aus Endsequenzen der BACs 125N12 (T7-Ende) und 97B8 (SP6-Ende) und den entsprechenden Bereichen der Aminosäuresequenz von *Beetle1* und *Beetle2*. Schwarz unterlegt sind identische Aminosäuren mit *Beetle1* bzw. konservierte Aminosäuren zwischen allen Sequenzen. Grau unterlegt sind identische Aminosäuren mit *Beetle2*. Striche zeigen die für ein optimales Alignment eingefügten Lücken an.

Southern-Hybridisierungen mit DNA-Sonden aus dem Protease-Bereich von *Beetle1* (Abb. 3.48, A), *Beetle2* (Abb. 3.48, B) und den Endsequenzen der BACs 125N12 (Abb. 3.48, C) und 97B8 (Abb. 3.48, D) an genomischer DNA von *B. procumbens* zeigten unterschiedliche Bandenmuster. In den Autoradiogrammen wurden neben *single-copy*-Signalen auch gleiche Hybridisierungssignal zwischen den verwendeten Sonden dokumentiert, welche in ihrer Intensität jedoch deutlich geringer waren und auf Kreuzhybridisierungen vor allem mit dem

konservernten 3'-Bereich der Protease-Sequenz (Abb. 3.47) hinweisen. Die unterschiedlichen Hybridisierungsmuster der einzelnen DNA-Sonden sprechen für die Präsenz anderer Ty3-gypsy-Familien im Genom von *B. procumbens*.

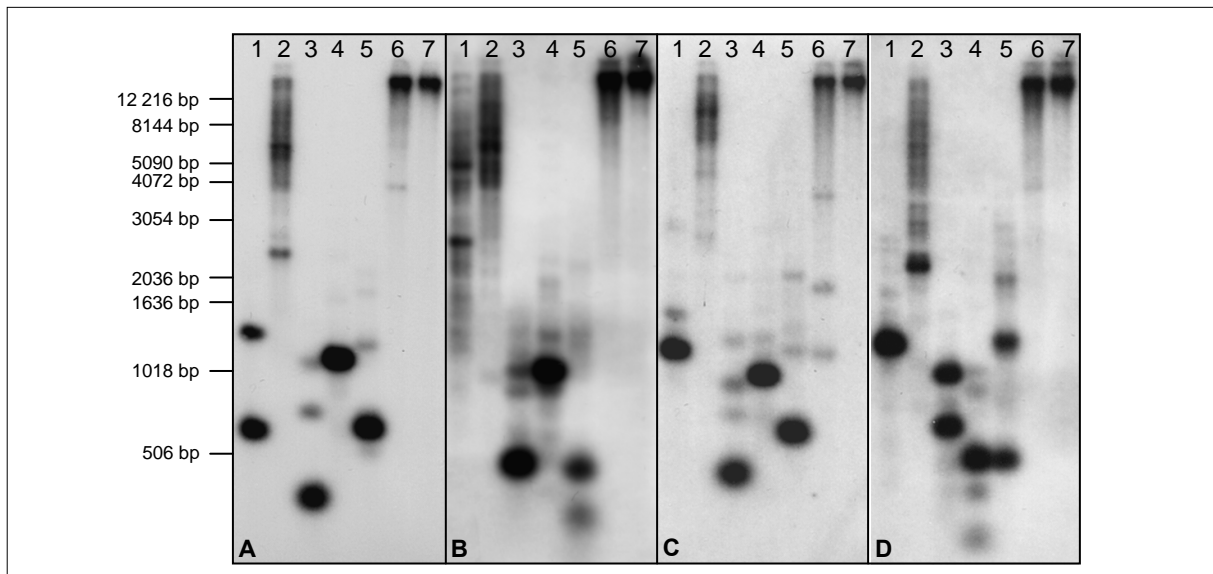


Abb. 3.48: Southern-Hybridisierung restringierter *B. procumbens*-DNA mit Sonden aus der Protease-Region verschiedener Ty3-gypsy-Retrotransposons

Autoradiogramme von Southern-Filtern mit restringierter *B. procumbens*-DNA nach Hybridisierung mit dem *Beetle1*-LTR (A), dem *Beetle2*-LTR (B), der T7-Endsequenz des BACs 125N12 (C) und SP6-Endsequenz des BACs 97B8 (D). Die *B. procumbens*-DNA wurde mit folgenden Restriktionsendonukleasen geschnitten: *Hind*III (1), *Eco*RI (2), *Hinf*I (3), *Rsa*I (4), *Sau*3AI (5), *Msp*I (6) und *Hpa*II (7).

Die Dot Blot-Hybridisierung der PRO1-BACs zeigte die Verteilung der Ty3-gypsy-Sequenzen aus den BAC-Enden innerhalb der Klassen I-III (Abb. 3. 49).

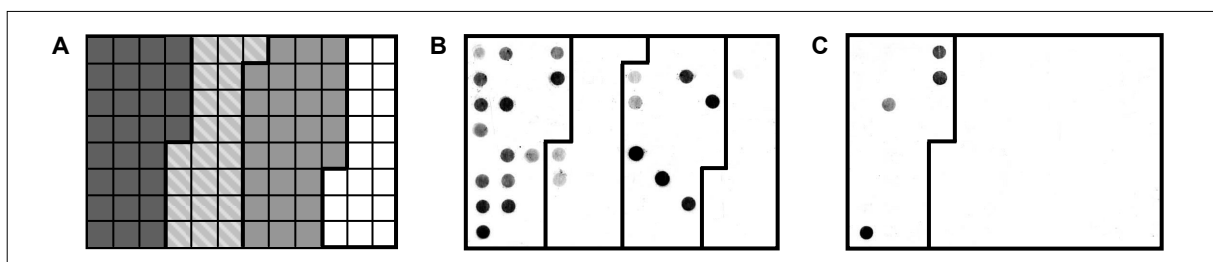


Abb. 3.49: Dot Blot-Hybridisierung minichromosomspezifischer PRO1-BACs mit Ty3-gypsy-spezifischen Sequenzen aus BAC-Endsequenzen

A) Auftragemuster der PRO1-BACs auf den Dot Blot-Filtern und deren Einteilung in die BAC-Klassen I (dunkelgrau), II (grau schraffiert), III (hellgrau). B) Hybridisierungsmuster der PRO1-BACs nach Hybridisierung mit der BAC-Endsequenz 97B8-SP6. C) Hybridisierungsmuster nach Hybridisierung mit der BAC-Endsequenz 125N12- T7.

Die SP6-Endsequenz des BACS 97B8 (Abb. 3.49, B) hybridisiert in allen drei Klassen, was für eine Verteilung nicht nur am Centromer, sondern auch in den angrenzenden mit dem pTS4.1-Satelliten verknüpften pericentromerischen Bereichen spricht. 15 von 28 BACs der Klasse I waren mit der 97B8-Sonde positiv. Nur zwei BACs der Klasse II, aus der direkt das Centromer flankierenden Region, enthielten diese Ty3-gypsy-Sequenz. Sieben der BACs der

Klasse III, die durch das überwiegende Vorkommen des pTS4.1-Satelliten charakterisiert werden, enthielten zur SP6-Sequenz des BACs 97B8 homologe Bereiche.

Die Endsequenz 125N12-T7 hybridisierte nur an vier PRO1-BACs, die ausnahmslos der Klasse I zuzuordnen sind. Demnach könnte es sich hierbei um einen Sequenzabschnitt eines nicht so abundanten, aber centromerspezifischen Ty3-*gypsy*-Retrotransposons handeln. Ob es sich bei den in den BAC-Endsequenzen identifizierten Ty3-*gypsy*-Sequenzen um andere *Beetle*-Familien handelt, kann nur nach der Charakterisierung der entsprechenden LTR-Sequenzen geklärt werden.

4 Diskussion

Die vollständige Sequenzierung eukaryotischer Genome ermöglicht nicht nur vergleichende Untersuchungen der Diversität von Retroelementen, sondern gestattet zudem die Erforschung des Einflusses, den Retrotransposons auf die Genomorganisation ausüben.

Durch die fehlende genetische und physikalische Kartierung ergeben sich in der *shotgun*-Sequenzierung besondere Schwierigkeiten in der Assemblierung repetitiver Sequenzen und in deren korrekter Zuordnung im Genom. In vielen Fällen bleiben deshalb die Regionen repetitiver DNA-Sequenzen, wie die NOR-Region, die Telomere und vor allem die Centromere, ausgespart oder werden durch Consensus-Sequenzen repräsentiert, die auf detailliert untersuchten Repeats dieser Regionen basieren (Peterson-Burch *et al.*, 2004).

Natürlich vorkommende bzw. künstlich erzeugte chromosomale Mutantenlinien bieten ein geeignetes experimentelles System für die molekulare Analyse der strukturellen Organisation von eukaryotischen Centromeren. So war eine Chromosomenmutante mit einem zusätzlichen Minichromosom in *Drosophila melanogaster* Ausgangspunkt für die Kartierung und Sequenzierung eines funktionellen Centromers (Murphy & Karpen, 1995; Sun *et al.*, 1997). Die Analyse des überzähligen B-Chromosoms in Mais ermöglichte neben der Aufklärung der Centromerstruktur zudem vergleichende Untersuchungen von Retrotransposons in der Centromer-Region der A- und B-Chromosomen (Theuri *et al.*, 2005). Mit der Identifizierung eines stabil vererbten Minichromosoms in *Arabidopsis thaliana* wurde die Sequenzanalyse an einer Chromosomenvariante möglich, die wahrscheinlich eine Mindestgröße eines funktionellen Centromers darstellt (Murata *et al.*, 2006).

Aus Kreuzungen der Zuckerrübe *Beta vulgaris* mit Wildarten der Sektion *Procumbentes* wurden die Linien PRO1 und PAT2 selektiert, welche zusätzlich zu den Zuckerrüben-Chromosomen ein sehr kleines Chromosomenfragment einer Wildrübe enthalten (Jung & Wricke, 1987). Diese Chromosomenderivate sind 6-9 Mbp groß und enthalten funktionelle Centromersequenzen (Gindullis *et al.*, 2001b). Da diese als Minichromosom bezeichneten Fragmente als Monosom vorliegen, entfallen Allelunterschiede, was die Analyse der Centromer-Region deutlich erleichtert.

BAC-Banken sind in den letzten Jahren zu wichtigen Werkzeugen in der eukaryotischen Genomanalyse geworden. Mit Insertionsgrößen von bis zu mehreren hundert Kilobasen bieten BACs die Möglichkeit zur molekularen Untersuchung größerer Genomabschnitte. Neben der Erstellung physikalischer Karten (Chen *et al.*, 2002) und der Kartierung agronomisch wichtiger Gene (Lange & Presting, 2004) sind BACs auch für vergleichende Analysen

zwischen Nutzpflanzen einsetzbar (Ilic *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von BACs an Mitose- und Meiose-Chromosomen eine Methodik zur Kartierung der klonierten Sequenzen vorhanden, welche Aussagen zur Genomstruktur erlaubt (Jiang *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2001).

BAC-Banken wurden bereits von vielen wichtigen Nutzpflanzen einschließlich Reis, Mais, Tomate, Hirse, Kartoffel und Sojabohne erstellt (Woo *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997; Salimath & Bhattacharyya, 1999; Budiman *et al.*, 2000; Fu & Dooner, 2000; Song *et al.*, 2000). Wichtige Basis sowohl für die Genomanalyse der Zuckerrübe *Beta vulgaris* als auch die molekulare Analyse eines definierten Pflanzencentromers wurde durch die Erstellung der ersten Zuckerrüben-BAC-Bank aus der Chromosomenmutante PRO1 gelegt (Gindullis *et al.*, 2001a).

Centromerische DNA-Sequenzen dienten im Reis der Identifizierung von BACs, die aus der Centromer-Region der Chromosomen 4 (*Cen4*), 8 (*Cen8*) und 3 (*Cen3*) stammen (Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Die Selektion Minichromosom-spezifischer BACs aus der PRO1-BAC-Bank erfolgte durch die Verwendung der centromerischen Satelliten pTS5 und pTS4.1, die ausschließlich für die Wildrübe *Beta procumbens* spezifisch sind (Schmidt & Heslop-Harrison, 1996).

Positive BACs wurden basierend auf den Einblicken in die Organisation der Satelliten-DNA in den Centromeren von *B. procumbens* (Gindullis *et al.*, 2001a) in vier Klassen eingeteilt. Dabei stellen die BACs der Klasse I und II Kandidanten dar, die Sequenzen aus der vermuteten „Core-Region“ des Centromers enthalten. Subklone von BACs der Klasse I offenbarten eine komplexe Organisation von LTR-Retrotransposons, die die Isolation vollständiger Kopien erschwert. Zusätzlich kommt es durch Rekombination im Genom zur Akkumulation deletierter und rearrangierter Retrotransposon-Sequenzen. Durch den Nachweis von homologen Subklonen konnte auf die Existenz mehrerer Retrotransposon-Kopien auf dem BAC 125N12 geschlossen werden. Weiterhin zeigten die BAC-Subklone, dass ein vollständiges LTR-Retrotransposon in ein anderes nicht homologes LTR-Retrotransposon integriert vorliegt. Dieses Transpositionsergebnis diente der gerichteten Isolation einer vollständigen *Beetle1*-Kopie. Durch Sequenzüberlappung von Subklonen und PCR-Amplifikationen wurde zusätzlich die Isolation einer fast vollständigen Kopie von *Beetle2* möglich. Es fehlen lediglich 23 Basenpaare vom 5'-Ende des 5'-LTR und sieben Basenpaare vom 3'-Ende des 3'-LTR.

4.1 Organisation und Struktur von *Beetle1* und *Beetle2*

LTR-Retrotransposons gehören zu den gut charakterisierten transponierbaren Elementen pflanzlicher Genome und zeichnen sich durch eine extreme Heterogenität hinsichtlich ihrer Sequenz und Abundanz aus (Bennetzen *et al.*, 1998). Die begrenzenden LTR-Sequenzen sind mehrere hundert bis tausend Basenpaar lang und enthalten für die Transkription wichtige Regionen. Sie spielen im Template-Wechsel während der Reversen Transkription eine Schlüsselrolle, da sie die Reassoziaton über homologe Sequenzbereiche vermitteln (Kumar & Bennetzen, 1999; Bennetzen, 2000; Wilhelm & Wilhelm, 2001).

Die LTR-Sequenzen von *Beetle1* und *Beetle2* unterscheiden sich bereits hinsichtlich ihrer Länge. *Beetle1* wird von 1091 bp (5'-LTR) bzw. 1089 bp (3'-LTR) langen LTR-Sequenzen eingerahmt, während die aus Überlappung der 5'- und 3'-LTR-Sequenzen bestimmte Länge der *Beetle2*-LTRs 774 bp beträgt. Der Sequenzvergleich zwischen *Beetle1*-LTR und *Beetle2*-LTR resultierte in einer Homologie von 43,3 %. Konservierte Regionen in den LTR-Sequenzen, wie für die centromerischen Retrotransposons aus Mais, Reis und Gerste beschrieben (Nagaki *et al.*, 2005), wurden nicht gefunden. Da die LTR-Sequenzen vermutlich eine wichtige Rolle in der gerichteten Integration einnehmen (Nagaki *et al.*, 2003a), könnten die Unterschiede in den LTR-Sequenzen für das abweichende Verteilungsmuster zwischen *Beetle1* und *Beetle2* verantwortlich sein. Eine Abschätzung der funktionellen Bedeutung der LTR-Sequenzen wäre zusätzlich durch einen Vergleich mit LTR-Bereichen centromerischer Ty3-gypsy-Retrotransposons aus *Beta vulgaris* denkbar.

Zwischen Retrotransposon-Familien variieren die LTR-Sequenzen stark (Nagaki *et al.*, 2003a) und ab einer Homologie unter 85 % fallen die LTR-Retrotransposons nicht mehr in eine Retrotransposon-Familie (Gribbon *et al.*, 1999). Somit kann man zwar von *Beetle*-Retrotransposons sprechen, muss jedoch *Beetle1* und *Beetle2* als Vertreter von zwei heterogenen Familien definieren.

Die charakteristischen Dinukleotide TG am 5'- und CA am 3'-Ende des LTRs wurden in beiden Retrotransposons identifiziert. Diese invertierten Sequenzwiederholungen kommen in allen Retroviren vor und nehmen in der Integration der synthetisierten Retrotransposon-Kopie als Erkennungssequenz für die Integrase eine wichtige Rolle ein (Temin, 1980). Sie stellen einen Teil der sechs (*Beetle1*) bzw. sieben (*Beetle2*) Basenpaar umfassenden invertierten Sequenzwiederholung dar.

Der 5'-LTR von *Beetle1* weist im Vergleich mit dem 3'-LTR Insertionen von zwei Basen und zwei Basenpaarsubstitutionen auf. Ob es sich statt der Insertionen im 5'-LTR um zwei Deletionen im 3'-LTR handelt, lässt sich nicht klären. Die Analyse eines Solo-LTRs von *Beetle1* resultierte mit 1089 bp exakt in der für den 3'-LTR ermittelten Gesamtlänge und lässt eher Insertionen in den 5'-LTR vermuten.

Für *Beetle2* konnten nur unvollständige LTR-Bereiche ermittelt werden. Unterschiedliche Strategien zur Ermittlung der fehlenden Sequenzen, wie Selektion von BAC-Subklonen mit Sequenzen aus dem *Beetle2*-LTR und lineare PCR führten nicht zur Komplettierung der LTRs der isolierten *Beetle2*-Kopie. Dieses könnte in der Existenz von Sequenzen aus unterschiedlichen *Beetle2*-Kopien oder rekombinierten *Beetle2*-Sequenzen begründet liegen. So war die Interspersion eines *Beetle2*-LTR mit dem pTS5-Satelliten auf dem BAC 125N12 nachweisbar. Allerdings entsprach diese LTR-Sequenz nicht der durch Integration von *Beetle1* klar definierten *Beetle2*-Kopie. Die überlappenden Bereiche aus 5'-LTR und 3'-LTR von *Beetle2* zeigen keine Indels und weisen an drei Positionen Basenpaarsubstitutionen auf. Insertionen oder Deletionen wurden nicht gefunden.

Die Transkription von LTR-Retrotransposons wird durch *cis*-Elemente im 5'-LTR und der benachbarten UTR kontrolliert (Kumar & Bennetzen, 1999). Funktionelle Analysen zeigten, dass solche *cis*-Elemente in *Tnt1* und *Tto1* innerhalb der U3-Region des 5'-LTRs liegen (Grandbastien *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1998, 1999). Zudem konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Expression durch stromaufwärts der TATA-Box gelegene *enhancer*-Elemente hochreguliert werden kann (Takeda *et al.*, 1998). Promotorelemente wie TATA-Box und Initiator (Inr)-Sequenz wurden innerhalb der LTR-Sequenzen von *Beetle1* und *Beetle2* identifiziert. Dabei zeigten *Beetle1* und *Beetle2* ein Motiv für eine Initiator-Sequenz mit folgender Konservierung 5'-YYCARR-3' (Brown, 2002). In *Beetle2* wurde zusätzlich eine stromaufwärts gelegene TATA-Box nachgewiesen. Ferner wurde in beiden Retrotransposons das Polyadenylierungssignal identifiziert, das in der U5-Region des LTR liegt und nur im 3'-LTR von funktioneller Bedeutung ist.

Angrenzend an den LTR-Sequenzen befinden sich mit der PBS (*primer binding site*) und dem PPT (polypurintract) weitere Sequenzen, die für die Transposition des Retrotransposons essentiell sind (Varmus & Brown, 1989). Die reverse Transkription wird sowohl bei Retroviren als auch bei Retrotransposons über die PBS in der Nähe des 5'-Endes der verpackten RNA initiiert. Eine zelluläre tRNA dient nach der Anlagerung an die PBS als Startpunkt für die Minusstrangsynthese während der Reversen Transkription (Mak &

Kleiman, 1997). Retroviren und Retrotransposons benutzen unterschiedliche tRNAs (Voytas & Boeke, 1993) und differenzieren zudem in der Anzahl an komplementären Basen zwischen der PBS und dem 3'-Ende der entsprechenden tRNA (Friant *et al.*, 1998).

Die PBS von *Beetle1* ist mit 15 Basen komplementär zum 3'-Ende einer tRNA_i^{Met}, wie sie in *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurde. Auch *Beetle2* initiiert die Reverse Transkription durch das Binden dieser tRNA-Spezies, weist jedoch mit zehn direkt aufeinander folgenden komplementären Basen eine kürzere Primerbindungsstelle für die tRNA auf. Weiterhin lassen sich abhängig von der Position der PBS zwei Gruppen in der Familie der Ty3-gypsy-Retrotransposons differenzieren, in denen die PBS überlappend oder nicht-überlappend mit dem 5'-LTR vorliegt (Chavanne *et al.*, 1998). *Beetle1* und *Beetle2* lassen sich der zweiten Gruppe zuordnen, da die Bindungsstelle für die tRNA durch zwei Nukleotide vom 5'-LTR separiert ist, was vermutlich dem Schutz der Minusstrang-DNA vor Degradation dient (Hizi & Levin, 2005). *Beetle1* und *Beetle2* haben mit den centromerischen LTR-Retrotransposons CRM aus *Zea mays* (Zhong *et al.*, 2002), CRR aus *Oryza sativa* (Kumekawa *et al.*, 2001) und *cereba* aus *Hordeum vulgare* (Hudakova *et al.*, 2001) die Bindung der tRNA_i^{Met} gemeinsam. Die Mindestanzahl an komplementären Basen zum 3'-Ende dieser tRNA lässt sich in allen untersuchten centromerischen LTR-Retrotransposons auf zehn Nukleotide festlegen. Innerhalb dieser Region sind bis auf CRM alle Ty3-gypsy-Retrotransposons identisch.

Direkt vor dem 3'-LTR befindet sich in *Beetle1* und *Beetle2* die Primerbindestelle für die Synthese des Plusstrangs (PPT). Mit 13 Purinen zeigt *Beetle2* einen deutlich längeren polypurinreichen Abschnitt als *Beetle1* mit neun direkt aufeinander folgenden Purinen auf. Dieser Anteil erhöht sich allerdings in *Beetle1* auf 11 Purine wenn man einen Bereich von 13 Nukleotiden untersucht, der sowohl in *Beetle2* als auch in CRM, CRR und *cereba* als PPT fungiert.

Die Region zwischen den LTRs beinhaltet mit den *gag*- und *pol*-Genen alle für die Transposition des Retrotransposons wichtigen Proteine (Boeke & Stoye, 1997). Der zwischen LTR und kodierendem Bereich liegende Sequenzabschnitt wird auch als untranslatierte Region (UTR) bezeichnet und kann stromaufwärts und/oder stromabwärts des *gag-pol*-Polyproteins vorhanden sein. Die 5'-UTR von *Beetle1* besitzt eine Länge von 180 bp.

Die Größenbestimmung der UTR von *Beetle2* (1359 bp) erfolgte über die Position möglicher Startcodons und den direkten Vergleich mit homologen *gag*-Sequenzen von *Beetle1*. Bis auf die Anwesenheit einer RNA-Bindedomäne in Form eines Zink-Fingers zeigt das *gag*-Gen nur

eine geringe Konservierung zwischen den Retrotransposons (Covey, 1986). Dies war auch hier der Fall und erschwerte die exakte Abgrenzung der *gag*-Region von der 5'-UTR von *Beetle2* erheblich, zumal mehrere potentielle Startcodons vorhanden waren. Datenbankrecherchen zeigten innerhalb der vermuteten 1359 bp langen UTR-Region von *Beetle2* kurze offene Leseraster mit Längen zwischen 10 und 100 Aminosäuren, die Übereinstimmungen zu Teilbereichen der *gag*-Region von LTR-Retrotransposons aus *Medicago truncatula*, jedoch nicht zu *Beetle1* aufwiesen. Diese ORFs folgten nicht direkt aufeinander oder lagen in verschiedenen Leserastern vor. Der hypothetische Start des *gag*-Gens mit dem ersten möglichen ORF, der Homologie zu *gag*-Bereichen von in der GenBank gespeicherten LTR-Retrotransposons zeigt, würde die UTR von *Beetle2* auf eine Länge von 211 bp reduzieren. Sie wäre somit in den gleichen Größenbereich wie die *Beetle1*-UTR einzuordnen. Die daraus resultierende *gag*-Region würde allerdings neben der Häufung von Stopcodons auch vermehrte Wechsel im Leseraster aufweisen und ist deshalb wenig wahrscheinlich. Jedoch zeigte die Untersuchung der Abstände zwischen Startcodon und Zinkfinger-Motiv, dass *Beetle2* mit 134 Aminosäuren eine weitaus geringere Distanz als *Beetle1* (319), *dell-46* (270) und die centromerischen Retrotransposons CRM (393), CRR (398) und *cereba* (429) aufweist und eine offenbar kürzere *gag*-Region besitzt. Für pflanzliche LTR-Retrotransposons ist bekannt, dass neben den LTR-Sequenzen auch die UTRs stark variieren. Die UTR-Regionen der CR-Subfamilien CRR1 und CRR2 in Reis weichen dabei stärker voneinander ab, als die entsprechenden *gag-pol*-Regionen (Nagaki *et al.*, 2003a).

Basierend auf den Homologien der DNA- und Aminosäure-Sequenzen zu bekannten LTR-Retrotransposons und der Anordnung der Gene im Polyprotein (Integrase liegt stromabwärts der Reversen Transkriptase/RNaseH) erfolgte eine Zuordnung von *Beetle1* und *Beetle2* zur Familie der Ty3-gypsy-Retrotransposons (*Metaviridae*; Hull, 2001). Die konservierten Aminosäure-Domänen für Protease, Reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase liegen in *Beetle1* und *Beetle2* in gleichen bzw. annähernd gleichen Abständen vor. Der Unterschied in der Länge des *gag-pol*-Bereichs von *Beetle1* (4344 bp) und *Beetle2* (3742 bp) beruht einzig auf der abweichenden Größe der *gag*-Region. In *Beetle1* und *Beetle2* liegen die *gag*- und *pol*-Gene in einem ORF. Viele identifizierte LTR-Retrotransposons besitzen einen einzigen ORF mit fusionierten *gag*- und *pol*-Genen, wobei diese Organisation vor allem in pflanzlichen LTR-Retrotransposons aufgefunden wurde (Havecker *et al.* 2004). Sowohl *Beetle1* als auch *Beetle2* zeichnen sich dabei durch Gene für das *gag-pol*-Polyprotein aus, die bis in den 3'-

LTR hinein reichen. Diese Struktur wurde auch in den Ty3-gypsy-Retrotransposons der CR-Familie identifiziert (Langdon *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004; Nagaki *et al.*, 2005) und könnte eine Eigenschaft centromerischer Retrotransposons sein. Die Analyse konservierter Bereiche innerhalb der *gag-pol*-Region erfolgte durch direkten Vergleich mit Ty3-gypsy-Retrotransposons, die bis auf *dell-46* (*Lilium henryi*, Smyth *et al.*, 1989) hochamplifiziert an den Centromeren in ausgewählten *Poaceae* vorkommen (Hudakova *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2002; Kumekawa *et al.*, 2001).

Innerhalb des *gag*-Gens wurde in *Beetle1* und *Beetle2* das hochkonservierte Motiv eines Zink-Fingers identifiziert, das der Consensus-Sequenz CX₂CX₄HX₄C entspricht (Covey, 1986). Der Zink-Finger bindet genomische RNA oder DNA und scheint deren Verpackung in VLPs zu unterstützen (Dawson *et al.*, 1997; Hansen & Heslop-Harrison, 2004).

Die Protease von LTR-Retrotransposons spaltet das Polyprotein in seine einzelnen funktionellen Bestandteile. Als konserviertes Motiv der Protease kann die Aminosäure-Abfolge LX₀₋₄DXG definiert werden (McClure, 1991). Ein in *Beetle1* und *Beetle2* identisches Protease-Motiv folgt dieser konservierten Aminosäure-Abfolge mit Ausnahme der ersten Aminosäureposition, die von einem Isoleucin (I) anstelle eines Leucin (L) besetzt wird. CRM, CRR und *cereba* stimmen damit überein, lediglich *dell-46* zeigt das Isoleucin. Das Aspartat (D) stellt das aktive Zentrum der Protease dar und ist in allen bekannten LTR-Retrotransposons konserviert (Chavanne *et al.*, 1998).

Das in *Beetle1* und *Beetle2* essentielle Motiv FXV₂VX₂DDI/VLI/VY der Reversen Transkriptase ist sowohl in Ty3-gypsy-Retrotransposons in *Poaceae* als auch in Kiefer (*Pinus pinaster* DQ394069; *Pinus radiata* AJ004945), *Arabidopsis thaliana* (AAC69377), Tomate (AAD13304) und Ananas (ACY12432) hoch konserviert.

Malik & Eickbush (2001) detektierten in einem Aminosäurevergleich der RNaseH aus diversen Retrotransposons vereinzelte Aminosäuren, die für die katalytische Funktion des Proteins wichtig sind und sich durch das Motiv DX₂₇₋₄₈EX₁₈₋₃₃DX₂₉₋₅₄D darstellen lassen. In diesem Bereich zeigten *Beetle1*, *Beetle2* und die anderen untersuchten Ty3-gypsy-Retrotransposons eine exakte Übereinstimmung mit der Abfolge DX₃₆EX₂₄DX₄₂D. Das konservierte Motiv T/CDAS der RNaseH ist häufig in Ty3-gypsy-Retrotransposons identisch (Springer & Britten, 1993).

Die Integrase befindet sich im 3'-Bereich des *gag-pol*-Polyproteins und kann in drei verschiedene Subdomänen eingeteilt werden (Ju & Skalka, 1980). Im N-terminalen Bereich liegt ein Zink-Finger (Malik & Eickbush, 1999), der für *Beetle1*, *Beetle2* und die

centromerassoziierten Ty3-gypsy-Retrotransposons aus der Familie der *Poaceae* mit $HX_6HX_{29}CX_2C$ definiert werden kann. Diese Region ist in der spezifischen Erkennung der LTRs innerhalb der „cutting and joining“-Reaktion beteiligt (Khan *et al.*, 1991). Zusammen mit dem katalytischen DD35E-Motiv sind beide Motive sowohl in Ty1-*copia*- und Ty3-gypsy-Elementen als auch in Retroviren zu finden (Hirochika *et al.*, 1996b). Diese Konservierung legt eine essentielle Rolle für die enzymatische Aktivität der Integrase nahe (Kulkosky *et al.*, 1992; Baker & Luo, 1994) und konnte experimentell nachgewiesen werden (Suoniemi *et al.*, 1998). Als drittes konserviertes Aminosäure-Muster ist in allen Ty3-gypsy-Retrotransposons am C-Terminus das GPY/F-Modul vorhanden (Peterson-Burch & Voytas, 2002). In *Beetle1* und *Beetle2* ist das GPF-Motiv 95 bzw. 94 Aminosäuren vor dem Stopcodon des *gag-pol*-Polyproteins aufzufinden. Malik & Eickbush (1999) ermittelten, dass in einigen Ty3-gypsy-Retrotransposons das Polyprotein im C-terminalen Bereich Sequenzen aufweisen, die Homologien zu Chromodomänen zeigen. Diese fakultative Domäne wurde in einer Reihe von Proteinen identifiziert, die in der Chromatin-Modifikation eine Rolle spielen (Koonin *et al.*, 1995). Die Interaktion mit Histon H3, DNA oder RNA vermittelt dabei die Formation von Heterochromatin (Hizi & Levin, 2005).

Sind *Beetle1* und *Beetle2* Chromoviren?

Die von Hizi & Levin (2005) durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen mit rekombinanten Integrasebereichen des Ty3-gypsy-Retrotransposons Tfl aus *Schizosaccharomyces pombe* zeigten deutlich, dass sowohl die Spezifität als auch die Aktivität der Integrase durch deren Chromodomäne moduliert wird. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die Interaktion zwischen der Tfl-Chromodomäne und Histon H3 zu einer räumlichen Struktur führt, die bei der Integration eine Rolle spielt. Nagaki *et al.* (2005) vermuteten, dass die bevorzugte Integration von CRR-Elementen in bzw. in die Nähe der mit dem centromerischen Histon H3 (CenH3)-assoziierten DNA-Region durch die Interaktion mit centromerischen Proteinen determiniert wird.

So zeigt die Integrase-Sequenz der centromerischen Retrotransposons deutliche Unterschiede (Gorinsĕk *et al.*, 2004). *Beetle1* und *Beetle2* zeigten in ihrer Integrase-Region deutliche Homologien mit den centromerischen Retrotransposons aus der *Poaceae*-Familie. *Beetle1* und *Beetle2* zeichnen sich, wie die centromerischen Retrotransposons CRM, CRR und *cereba*, durch ein durchgehendes *gag-pol*-Polyprotein aus, das bis in den 3'-LTR reicht. Im 3'-Bereich wurde in den Ty3-gypsy-Retrotransposons aus den *Poaceae* eine Chromodomäne lokalisiert, was sie in die eigenständige Gruppe der Chromoviren einordnen lässt. Bei der

Betrachtung der in der Region der Chromodomäne liegenden Aminosäure-Sequenzen wird die Eingruppierung zu den centromerischen Chromoviren deutlich. Dabei bestehen Unterschiede mit den Chromodomänen aus nicht-centromerischen LTR-Retrotransposons und den authentischen Chromodomänen der Chromatin-modifizierenden Proteinen HP1 und Swi6. Die abweichenden Motive in der Chromodomäne könnten dabei für die Insertionsspezifität in centromerische Regionen verantwortlich sein (Singleton & Levin, 2002; Gorinsĉ *et al.*, 2004; Kordiř, 2005).

Neben der geringen Divergenz von *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen, sowohl im Genom von *B. procumbens* als auch in den anderen Arten der Sektion *Procumbentes*, spricht auch das junge Alter und die Transkriptionsaktivität für eine Einordnung dieser Ty3-gypsy-Retrotransposons in die Gruppe der Chromoviren (Nagaki *et al.*, 2005; Kordiř, 2005).

4.2 Das Alter von *Beetle1* und *Beetle2*

SanMiguel *et al.* (1998) schlug mit der „Paläontologie der Retrotransposons“ eine Methode zur Berechnung des Insertionszeitpunktes von LTR-Retrotransposons im Maisgenom vor. Die Datierung basiert dabei auf der Bestimmung der Nukleotiddivergenz zwischen den LTRs eines Retrotransposons. Zu dem Zeitpunkt, an dem ein Retrotransposon in das Genom inseriert, sind die LTRs absolut identisch (SanMiguel *et al.*, 1998). Im Laufe der Zeit treten innerhalb der LTRs Mutationen auf, die ungefähr der Genomrate im Wert gleichzusetzen sind (Peterson-Burch *et al.*, 2004).

Unter Verwendung der synonymen Substitutionsrate des *Adh2*-Gens in der *Poaceae*-Familie von $6,5 \times 10^{-9}$ Substitutionen/LTR/Jahr (Gaut *et al.*, 1996) erfolgten die ersten Altersberechnungen für LTR-Retrotransposons aus Getreide (SanMiguel *et al.*, 1998).

Die schnelle Amplifikation von LTR-Retrotransposons und das damit verbundene Rekombinationspotential führen zu Sequenzdivergenzen, die in intergenischen Regionen höher als in den kodierenden Regionen liegen können (Ma & Bennetzen, 2004; Du *et al.*, 2006). Auch die heterochromatischen Regionen sind von Rekombinationen nicht ausgeschlossen, was durch die hohe Frequenz von Solo-LTRs im funktionellen Bereich von *Cen8* gezeigt wurde (Ma & Bennetzen, 2006).

Die Beobachtung, dass unterschiedliche Klassen von DNA verschiedenen Evolutionsraten unterworfen sind (Ma & Bennetzen, 2006) führte zur Neubestimmung der molekularen Uhr (*molecular clock*, MC) von Retrotransposons in Reis (Piegu *et al.*, 2006). Mit der MC1 definierten Vitte *et al.* (2004) die für LTR-Retrotransposons anzuwendende Substitutionsrate

auf 2×10^{-8} Substitutionen/LTR/Jahr in Süßgräsern. Ma & Bennetzen (2004) ermittelten eine synonyme Substitutionsrate für transponierbare Elemente, die im Vergleich zu Genen zweifach erhöht ist, und legten mit der MC2 eine Rate von $1,3 \times 10^{-8}$ Substitutionen/LTR/Jahr zugrunde. Mit $1,5 \times 10^{-8}$ Substitutionen/LTR/Jahr für *Brassicaceae* (Koch *et al.*, 2000) $5,2 \times 10^{-9}$ Substitutionen/LTR/Jahr für Leguminosen (Pfeil *et al.*, 2005) stehen auch Werte für die Altersberechnung von LTR-Retrotransposons in dikotylen Pflanzen zur Verfügung.

Die Divergenz zwischen 5'- und 3'-LTR sowohl in *Beetle1* als auch *Beetle2* war mit Werten von 0,18 % bzw. 0,39 % sehr gering. Das Alter wurde basierend auf diesen Sequenzdivergenzen unter Verwendung der aufgeführten Substitutionsraten berechnet. Die LTR-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* variieren in ihrem Alter je nach verwendeter Substitutionsrate zwischen ungefähr 100 000 Jahren und 350 000 Jahren. Ein Großteil der detektierten LTR-Retrotransposons ist in allen untersuchten Pflanzenarten erst innerhalb der letzten 0-4 Mio. Jahre integriert (Bennetzen *et al.*, 2005). Dieses vorrangige Auffinden junger LTR-Retrotransposons meist als Resultat explosionsartiger LTR-Transkriptionsaktivitäten interpretiert (SanMiguel & Bennetzen, 1998; Wicker *et al.*, 2001; Devos *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004; Piegu *et al.*, 2006). Andererseits stellt sich die Frage, ob nicht die einwirkenden Rekombinationsmechanismen das Auffinden älterer Retrotransposon-Kopien erschweren (Vitte & Bennetzen, 2006). Ma *et al.* (2004) geben für die LTR-Retrotransposons in Reis eine Halbwertszeit von weniger als sechs Millionen Jahren an. Trotzdem scheinen die centromerischen Retrotransposons innerhalb der Getreide seit deren Trennung vor etwa 60 Millionen Jahren konserviert zu sein (Houben *et al.*, 2007). Ihr diagnostiziertes junges Alter (0-2 Millionen Jahre) lässt eine hohe Dynamik und schnelle Evolution in der funktionellen Region des Centromers vermuten (Nagaki *et al.*, 2003a).

4.3 *Beetle1* und *Beetle2* – abundante DNA-Komponenten im Genom von *B. procumbens*

Die Southern-Analyse mit restringierter *B. procumbens*-DNA zeigte, dass die isolierten Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* eine hochabundante DNA-Komponente im Genom von *B. procumbens* darstellen. Neben vielen klar abgrenzbaren Restriktionsfragmenten wurden für jede verwendete DNA-Sonde vor allem hochmolekulare Bereiche detektiert, in denen sich unterschiedliche Restriktionsfragmente akkumulierten und nach Hybridisierung in einem Banden-„Schmier“ resultierten.

Die Häufigkeit von *Beetle1* und *Beetle2* wurde zudem aus der Auswertung der Endsequenzen von 24 PRO1-BACs, die aus der centromerischen und pericentromerischen Region des Minichromosoms stammen, deutlich. 37,5 % der BAC-Endsequenzen zeigten Homologie zu Retrotransposons, davon mehr als 77 % dieser Sequenzen konnten der *Beetle1*-Familie zugeordnet werden. Minichromosomspezifische BACs der *Beta vulgaris*-Translokationslinie (TR520) zeigten einen Gehalt an repetitiven Sequenzen, der zwischen 14,7 % und 43,3 % variierte, wobei der Großteil von LTR-Retrotransposons gestellt wurde (Schulte *et al.*, 2006). Die Akkumulation von LTR-Retrotransposons in centromerischen und pericentromerischen Regionen wurde bereits durch verschiedene Genomsequenzierungs-Projekte offenbart (Wu *et al.*, 2004; Peterson-Burch, 2004). LTR-Retrotransposons bilden zu mindestens 67 % die Centromer-Region des Reis-Chromosoms 8 (Ma & Bennetzen, 2006).

4.4 Konservierung der *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen und deren Verbreitung in der Gattung *Beta*

Die Southern-Analyse lässt neben Aussagen zur Abundanz von *Beetle1* und *Beetle2* im Genom auch Aussagen zur Konservierung der *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen zu. Wenn auch in *Beetle1* in höherem Maße, ist in beiden *Beetle*-Familien die DNA-Sequenz stark konserviert. Die Anwesenheit gleicher Schnittstellen innerhalb der Retrotransposon-Sequenz resultierte in konservierten Restriktionsfragmenten, die als starke Hybridisierungssignale detektiert wurden. Für *Beetle1* wurde im Vergleich zu *Beetle2* eine deutlich höhere Anzahl dieser konservierten Schnittstellen detektiert.

Diese Beobachtung wurde durch die Divergenzanalyse von *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen aus den einzelnen Domänen des *gag-pol*-Polyproteins gestützt. Dabei waren die aus *B. procumbens* amplifizierten DNA-Sequenzen für *Beetle1* innerhalb einer Domäne zu mindestens 91,8 % homolog. Auch für *Beetle2* wurden ähnliche Homologiewerte und damit nur geringe Sequenz-Divergenzen festgestellt. Die PCR-basierte Sequenzanalyse resultierte nur in der Amplifikation von Retrotransposon-Sequenzen, die innerhalb der Primersequenzen zur isolierten *Beetle1*- bzw. *Beetle2*-Kopie identisch waren. Die Klonierung der in den starken Hybridisierungssignalen konzentrierten Restriktionsfragmente könnte eine Studie zur Divergenz der Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2* weitaus aussagekräftiger gestalten.

Die Southern-Hybridisierung mit *HinfI*-restringierter genomischer DNA von Arten aller Sektionen der Gattung *Beta* zeigte unter Verwendung der LTR-Sonden für *Beetle1* und *Beetle2* das ausschließliche Vorkommen beider LTR-Retrotransposons in den drei Arten

B. procumbens, *B. webbiana* und *B. patellaris* der Sektion *Procumbentes*. Neben dieser Sektionsspezifität ist auch eine Artspezifität bis hin zu Chromosomenspezifität für repetitive DNA-Sequenzen bekannt (Kubis *et al.*, 1998; Schmidt & Heslop-Harrison, 1998; Jiang *et al.*, 2003). Cheng *et al.* (2002) beschrieben die Komposition centromerischer DNA-Sequenzen auch in eng verwandten Arten als extrem variabel.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Amplifikation der Ty3-gypsy-Retrotransposons *Beetle1* und *Beetle2*, die erst nach der Separation der Sektionen stattgefunden hat. Artspezifische Amplifikationsmuster wurden bereits für verschiedene Satelliten der Gattung *Beta* beschrieben (Kubis, *et al.*, 1998; Gindullis *et al.*, 2001b; Dechyeva *et al.*, 2003).

DNA-Sonden aus dem Reverse Transkriptase-Gen beider *Beetle*-Retrotransposons detektierten in allen Sektionen der Gattung *Beta* homologe Sequenzbereiche. Im Genom des Spinats als Vertreter der *Chenopodiaceae*-Familie (Stern & Palmer, 1986) und evolutionäre Außengruppe zu den *Beta*-Arten (Senda *et al.*, 1995) wurde bei keiner der verwendeten DNA-Sonden ein Hybridisierungssignal detektiert. Die von Gindullis *et al.* (2001b) mit degenerierten Primern für die Reverse Transkriptase-Region isolierten Ty3-gypsy-Sequenzen pBv26 aus *B. vulgaris* und pBp10 aus *B. procumbens* zeigten in der Southern-Hybridisierung durchweg Signale in allen Sektionen der Gattung *Beta*, die sich in ihrem Muster von *Beetle1* und *Beetle2* deutlich unterscheiden. Zudem konnten mit der pBv26- und pBp10-Sonde auch im Spinat Sequenzen aus der Region der Reversen Transkriptase detektiert werden (Gindullis *et al.*, 2001b). Dieses Ergebnis zeigt, dass zwar der LTR zur eindeutigen Einteilung in Retrotransposon-Familien dient, aber auch die *gag-pol*-Polyproteine trotz ihrer Konservierung noch eine genügend große Divergenz zur Differenzierung einzelner Familien aufweisen.

Die Reverse Transkriptase-Sonden von *Beetle1* und *Beetle2* detektieren somit in den anderen Sektionen der Gattung *Beta* (*Beta*, *Corollinae*, *Nanae*) die DNA-Sequenzen, die vermutlich centromer-assoziierten LTR-Retrotransposons zuzuordnen sind.

4.5 Transkriptionsaktivität von *Beetle1* und *Beetle2*

Obwohl in Pflanzen viele LTR-Retrotransposon-Sequenzen identifiziert wurden, zeigen bisher nur die Ty1-*copia*-Retrotransposons *Tnt1* und *Tto1* aus Tabak und *Tos17* aus Reis eine Transpositionsaktivität. Alle drei LTR-Retrotransposons sind unter normalen Bedingungen inaktiv. Erst unter Stressbedingungen wie Protoplastierung (*Tnt1*) oder Gewebekultur (*Tto1*, *Tos17*) wird die Transkription aktiviert und eine Transposition ist nachweisbar (Grandbastien *et al.*, 1989; Pouteau *et al.*, 1991; Hirochika, 1993; Hirochika *et al.*, 1996a). Weiterhin führen die Abwehr von Pathogenen oder Stressfaktoren, wie sie durch Verwundung oder Behandlung

mit mikrobiellen Elizitoren und Pflanzenhormonen ausgelöst werden, zur Aktivierung der Transkription und Translation (Grandbastien *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 1998, 1999).

Für *Tos17* konnte unlängst eine epigenetische Regulation der Transkription nachgewiesen werden. Während die Original-Kopie von *Tos17* in allen untersuchten Reisarten methyliert ist, zeigen die transponierten Kopien in Kalli keine Methylierung. Der Methylierungsgrad von *Tos17* steigt mit dem Pflanzenwachstum an und zeigt in der nächsten Generation einen signifikanten Status. (Cheng *et al.*, 2006)

Die Charakterisierung von EST (*expressed sequence tag*)-Banken führte zur Identifizierung von cDNAs, die Homologien zu LTR-Retrotransposons aufwiesen (Gorinsěk *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005; Rocheta *et al.*, 2006). Auffällig hierbei war die hohe Anzahl in EST-Banken, die aus gestressten Pflanzen oder Geweben erstellt wurden, was auf eine Aktivierung von LTR-Retrotransposons durch biotischen und abiotischen Stress schließen lässt (Gorinsěk *et al.*, 2004). In Weizen konnte eine Akkumulation von Retrotransposon-Transkripten als Reaktion auf mykotoxischen und nicht-mykotoxischen *Fusarium*-Stress identifiziert werden (Ansari *et al.*, 2007). Transkripte mit signifikanter Homologie zu den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons der *Poaceae* wurden auch in dikotylen Pflanzen, wie *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus*, *Brassica oleracea* und *Medicago truncatula* gefunden (Gorinsěk *et al.*, 2004). Zudem lassen sich mit homologen Transkripten aus *Picea glauca* und *Pinus taeda* Sequenzen centromerischer Retrotransposons in Gymnospermen nachweisen, was gegen deren begrenzte Verbreitung nur innerhalb der *Poaceae* spricht (Gorinsěk *et al.*, 2004).

Die RT-PCR führte zur Amplifikation von *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen. Für *Beetle1* wurden Transkripte aller charakteristischen Domänen des *gag-pol*-Polyproteins einschließlich der UTR und der LTRs nachgewiesen. Die Sequenzanalyse von zwei unabhängigen Klonen zeigte exakt die gleichen DNA-Sequenzen. Ähnlich fiel die Analyse der cDNA-Klone für *Beetle2* aus. Identische cDNA-Amplikons wurden für LTR, RNaseH und die Integrase-Region ermittelt. Die untersuchten DNA-Sequenzen wichen in geringem Umfang von den in dieser Arbeit charakterisierten *Beetle1*- und *Beetle2*-Kopien ab. Es wurden Homologien ermittelt, die für *Beetle1* zwischen 90,3 % und 100 % und für *Beetle2* zwischen 81,1 % und 100 % lagen. Warum für *Beetle1* jeweils zwei identische cDNA-Sequenzen in allen sieben Sequenzbereichen kloniert wurden, lässt sich schlecht durch die zufällige Klonierung ein und desselben PCR-Produktes erklären. Eher sind Transkripte eines *Beetle1*-Elements denkbar. Hierfür sprechen die Analysen in Reis die zeigten, dass nur wenige transponierbare Elemente der gezielten Stilllegung entgehen (Neumann *et al.*, 2007). Die Southern-Hybridisierung

zeigte für die *Beetle1*-und *Beetle2*-Sequenzen einen hohen Grad an DNA-Methylierung, sodass für beide Elemente, wie für die meisten LTR-Retrotransposons in Pflanzen (Vicient *et al.*, 2001a), ein geringes Transkriptionsniveau zu vermuten ist.

Die RT-PCR ermöglichte es, die transkriptionsaktiven Kopien von *Beetle1* und *Beetle2* im Genom von *B. procumbens* nachzuweisen. Diese unterschieden sich allerdings von *Beetle1* und *Beetle2* aus dem BAC 125N12. So konnten zwar 18 ESTs durch GenBank-Recherchen identifiziert werden, die dem CRM-Retrotransposon zuzuordnen sind, jedoch war es nicht möglich eine Voll-Längen-cDNA in Mais nachzuweisen (Topp *et al.*, 2004). Ähnliche Befunde resultierten aus der Untersuchung von Voll-Längen-cDNAs und ESTs aus Reis, in denen hauptsächlich partielle Retrotransposon-Transkripte und Transkripte mit chimären Strukturen aber keine Voll-Längen-cDNA der kompletten Polyprotein-kodierenden Region aufgefunden wurden (Neumann *et al.*, 2007).

Scheint in großen Retrotransposon-Familien die Mehrheit der LTR-Retrotransposons zur Transkription funktioneller Polyproteine nicht in der Lage zu sein (Suoniemi *et al.*, 1998), könnten auch synonyme Basenpaarsubstitutionen eine abgewandelte dreidimensionale Struktur der mRNA bewirken und dadurch die Stabilität des Transkriptes beeinflussen (Bennetzen *et al.*, 2005).

Mit dem Ty3-gypsy-Retrotransposon *Orge* aus *Pisum sativum* und dem Ty1-copia-Retrotransposon CIRE1 aus *Citrus sinensis* wurden LTR-Retrotransposons beschrieben, die eine konstitutive Transkription aufweisen (Neumann *et al.*, 2003; Rico-Cabanas & Martinez-Izquierdo, 2007). Die Transkription von LTR-Retrotransposons ist jedoch nicht zwangsläufig mit der Transposition verknüpft. Das Ty1-copia-Retrotransposon BARE-1 aus Gerste wird in Blättern stark transkribiert (Suoniemi *et al.*, 1996), dennoch konnte eine Transposition nicht nachgewiesen werden. Im Fall des Ty1-copia-Retrotransposons aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Bildung einer einzigen cDNA auf 14 000 Ty1-Transkripte gezeigt (Curcio & Garfinkel, 1999).

Luo & Preuss (2003) vermuten, dass die strangspezifische Methylierung langer Sequenzabschnitte in der Centromer-Region von *Arabidopsis thaliana* zur Regulation der Transkription von individuellen DNA-Strängen dient. In methylierungsdefizienten *Arabidopsis thaliana*-Mutanten konnten Transkripte transponierbarer Elemente von beiden DNA-Strängen identifiziert werden (Lippman *et al.*, 2004). Die Transkription durch verschachtelte Retrotransposon-Strukturen, in denen auch Insertionen in reverser Orientierung

auftreten, könnte in Mais zur Ansammlung reverser CRM-Transkripte geführt haben (Topp *et al.*, 2004). Solche Strukturen, in denen *Beetle1* in reverser Orientierung in *Beetle2* transponierte, wurden in BACs identifiziert und könnten die Entstehung von Transkripten mit beiden Orientierungen ermöglichen. Strangspezifische RT-PCRs dienen im Mais dem Nachweis der CRM-Transkripte in beiden Orientierungen (Topp *et al.*, 2004). In der Anwesenheit von Transkripten beider DNA-Stränge könnten, so vermuteten Dawe (2003) und Martienssen (2003), zur Bildung von doppelsträngiger RNA führen, welche die Grundlage für die RNA-vermittelte Heterochromatisierung der Centromer-Region bildet. Heute ist bekannt, dass ein geringes Transkriptionsniveau transponierbarer Elemente für die Etablierung des Heterochromatins durch RNA-Interferenz notwendig ist (zusammengefasst in: Bernstein & Allis, 2005; Matzke & Birchler, 2005).

4.6 Insertionsspezifität und Zielsequenzen von *Beetle1*

Retrotransposons bergen durch ihre Ausbreitung im Genom ein erhöhtes Mutationsrisiko für den Wirtsorganismus, von dessen Überleben aber gleichsam die eigenen Überlebenschancen abhängen. Infolge dieser Abhängigkeit ist der Selektionsdruck für Mechanismen, die zur Vermeidung von letalen Mutationen dienen, groß. Daher ist es kein Zufall, dass sich bei verschiedenen Retrotransposons eine Zielortspezifität entwickelt hat, die Transposoninsertionen zu genarmen Regionen des Genoms dirigiert. Eine Akkumulation von Retrotransposons müsste demnach in Regionen mit geringer Gendichte erfolgen, da die Integration dort weitgehend neutral ist und negative Effekte ausbleiben (Peterson-Burch *et al.*, 2004). Zwar wurde in *Arabidopsis thaliana* eine Anhäufung von LTR-Retrotransposons am Centromer aufgefunden, jedoch konnte weder eine erhöhte Abundanz in anderen heterochromatischen Regionen (*knobs*) noch die Insertion innerhalb genreicher Regionen in bereits vorhandene transponierbare Elemente, sogenannte „safe havens“ gezeigt werden (Peterson-Burch *et al.*, 2004).

Eine unterschiedliche Verteilung transponierbarer Elemente entlang der Chromosomen konnte in vielen Organismen ermittelt werden. In *Drosophila* zeigten LTR-Retrotransposons ein keineswegs zufälliges Verteilungsmuster (Dimitri & Junakovic, 1999). Analysen in *Arabidopsis thaliana* ergaben, dass ein wesentlicher Unterschied in der chromosomalen Verteilung der *Metaviridae* im Vergleich zu den *Pseudoviridae* und non-LTR-Retrotransposons besteht (Peterson-Burch *et al.*, 2004). Dabei scheint die signifikante Akkumulation von Ty3-gypsy-Retrotransposons im pericentromerischen Heterochromatin

eine grundsätzliche Eigenschaft von *Metaviridae* zu sein, wobei die gerichtete Integration in diese Regionen wahrscheinlich durch Erkennen eines spezifischen Chromatinstatus vermittelt wird (Peterson-Burch *et al.*, 2004). Das Auffinden konservierter Bereiche sowohl innerhalb der LTRs autonomer und nicht-autonomer centromerischer Retrotransposons aus Reis (CRRs), als auch innerhalb von centromerischen Retrotransposons aus verschiedenen Arten wie Reis (CRR) und Mais (CRM) und Gerste (*cereba*) lässt einen Einfluss dieser Sequenzen auf die Zielortspezifität vermuten (Nagaki *et al.*, 2003a, 2005).

Ein methodischer Ansatz zur Bestimmung der Zielsequenzverdopplung (*target site duplication*, TSD) bzw. der LTR-flankierenden DNA-Regionen ist die inverse PCR. Dabei ergaben sich durch die Nachbarschaft zahlreicher *Beetle1*-Elemente viele PCR-Produkte. Zur systematischen Untersuchung von *Beetle1*- und *Beetle2* flankierenden Bereichen war diese Methode eher ungeeignet, da diese LTR-Retrotransposons vorwiegend in rekombinanten und komplexen Strukturen vorliegen. Die TSDs wurden durch Subklonierung, PCR und Datenbankrecherchen ermittelt. Auffallend war die Längenvariation in den für die *Beetle1*-Familie ermittelten TSDs. Sie rangierten im Bereich zwischen fünf und acht Basenpaaren. Die charakteristische TSD-Länge von LTR-Retrotransposons beträgt vier bis fünf Basenpaare, selten drei Basenpaare (Boeke & Corces, 1989).

Die durch Integration in die *Beetle2*-Kopie verursachte TSD umfasst fünf Basenpaare. Zielsequenzverdoppelungen in dieser Größe wurden als Signatur am Terminus der CRR-Elemente (Lamb & Birchler, 2003) und der meisten Chromoviren (Gorenšik, 2005) beobachtet. Für die Integration von *Beetle1* in den pTS5-Satelliten hingegen scheinen TSDs von sieben bis acht Basenpaaren charakteristisch zu sein. Die ermittelten TSDs bzw. Sequenzen am Integrationsort wiesen keine Konservierung auf. So gaben Ma & Bennetzen (2004) die Wahrscheinlichkeit mit 1 : 1000 an, dass LTR-Retrotransposons den gleichen Integrationsort aufweisen. Die in Reis beobachteten identischen TSDs gingen aus Duplikationen hervor (Ma & Jackson, 2006).

Sowohl die *Metaviridae* als auch die *Pseudoviridae* aus Hefen zeigen auffallende Insertionspräferenzen. Während die *Pseudoviridae* Ty1, Ty2 und Ty4 in die 5'-Region von tRNA-Genen transponieren, besitzt das *Metaviridae* Ty5 eine Präferenz für die Integration in heterochromatische Bereiche (Sandmeyer, 2003). Die Analyse der *Beetle1*-Zielorte stellte eine Präferenz für die Integration in *Beetle1*-Kopien, in *Beetle2* und in Repeats des pTS5-Satelliten heraus und unterstrich durch die Interspersion mit diesen pericentromerischen Sequenzen, dass die *Beetle1*-Familie eine bedeutende Komponente des Heterochromatin der

Centromer-Region ist. Die Formation der heterochromatischen Blöcke aus LTR-Retrotransposons, welche in komplexen Strukturen organisiert sind, wurde eingehend beschrieben (SanMiguel *et al.*, 1996; Wicker *et al.*, 2001; Rostoks *et al.*, 2002; Ma & Jackson, 2006). Eine komplexe Organisation und Interspersion über mehrere Megabasen wurden für CRM und CRR beschrieben (Cheng *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004b). In Mais erfolgten viele Insertionen von LTR-Retrotransposons in andere Retrotransposon-Familien, wobei Integrationen bis in die dritte Ebene gefunden wurden (Du *et al.*, 2006).

Bei der Integration von *Beetle1* in pTS5 wurden beide Orientierungen des Satelliten gefunden. Dabei könnte entweder *Beetle1* sowohl in 5'→3'- als auch 3'→5'-Orientierung in den pTS5-Satelliten oder in Satelliten-Blöcke unterschiedlicher Orientierung integriert sein. Eine Integration von *Beetle1* in 3'→5'-Richtung wurde innerhalb des Interspersionsmusters zwischen *Beetle1* und *Beetle2* diagnostiziert. Auch in *Drosophila* fanden Sun *et al.* (2003) die centromerischen LTR-Retrotransposons in beiden Orientierungen vor.

4.7 Mechanismen, die der Akkumulation von *Beetle1* und *Beetle2* entgegenwirken

4.7.1 Eliminierung transponierbarer Elemente

LTR-Retrotransposons verursachen durch die Transposition per *copy and paste*-Modus eine Erhöhung ihrer Kopienzahl. So tragen neben der Polyploidisierung die meist explosionsartigen Retrotranspositionen zur Expansion pflanzlicher Genomgrößen bei (SanMiguel *et al.*, 1998; Wendel & Wessler, 2000). Das ubiquitäre Vorkommen von transponierbaren Elementen und die Tatsache, dass der Großteil der pflanzlichen LTR-Retrotransposons erst innerhalb der letzten Millionen Jahre transponierten (Marin & Llorens, 2000; McCarthy *et al.*, 2002; Vitte & Panaud, 2003; Bennetzen *et al.*, 2005), lässt die Entfernung älterer transponierbarer Elemente vermuten (Bennetzen, 2002; Vitte & Panaud, 2005). Es gibt somit Prozesse, die zur Eliminierung von Retrotransposon-Sequenzen führen und aktiv einer „Obesity“ (Bennetzen & Kellogg, 1997) der Genome entgegensteuern (SanMiguel & Bennetzen, 1998; Wendel & Wessler, 2000; Ma & Bennetzen, 2004).

PCR-Analysen der mit dem *Beetle1*-LTR positiven BACs zeigten, dass lediglich knapp 47 % vollständige Retrotransposons enthalten. Für *Beetle2*-Sequenzen gestaltet sich das Bild ähnlich. Von 30 mit dem *Beetle2*-LTR-Sonde positiven BACs weisen nur 10 BACs Amplikons mit den Primern für PBS und PPT im erwarteten Größenbereich von 5137 bp auf. Zudem wurden drei BACs identifiziert, die mit einem PCR-Produkt von 12 kb vermutlich die Integration von *Beetle1* in *Beetle2* zeigen. Fraglich ist an diesem Punkt, ob es sich hierbei um

unabhängige Transpositionereignisse handelt oder ob ein Integrationsort von allen drei BACs abgedeckt wird. Zum einen resultiert die BAC-Bank aus partiell restringierter genomischer DNA und besitzt eine 8,3 fache Genomabdeckung, was die Existenz sowohl gleicher als auch überlappender BACs erklärt, zum anderen wurden zwei unabhängige Integrationen von *Beetle1* in *Beetle2* nachgewiesen. Nur die genaue Sequenzanalyse der Integrationsorte von *Beetle1* in *Beetle2* kann in diesem Fall Klarheit verschaffen. Des Weiteren ist aus der PCR-Untersuchung nicht ersichtlich ob es sich, bedingt durch die *HindIII*-Klonierung und die Häufigkeit interner Schnittorte in *Beetle1* und *Beetle2*, um unvollständig klonierte Retrotransposon-Sequenzen handelt oder ob Rekombinationsereignisse zu dem Verhältnis zwischen LTR-Sequenzen und *gag-pol*-Amplikons geführt haben. Die Sequenzierung von Restriktionsfragmenten, die vollständige LTR-Bereiche beherbergen oder kompletter BACs könnten der Klärung dieser Frage dienen.

Die Rekombinationsmechanismen, die auf LTR-Retrotransposons im Genom einwirken, wurden in Pflanzen ausführlich erforscht (Devos *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004; Vitte & Panaud, 2003, 2005). So führt die ungleiche homologe Rekombination zwischen LTRs zur Entstehung von Solo-LTRs. Diese Solo-LTRs sind nicht mit internen Retrotransposon-Regionen verbunden, sondern zeichnen sich durch direkte Sequenzwiederholungen an ihren Enden aus. Dabei kann die Formation von Solo-LTRs sowohl durch Rekombination innerhalb eines Retrotransposons als auch Rekombination zwischen verschiedenen Retrotransposons erfolgen. Verbleibt durch die ungleiche homologe Rekombination innerhalb eines Retrotransposons ein Solo-LTR im Genom, zeigt sich die Rekombination zwischen den LTR-Sequenzen von zwei unabhängigen LTR-Retrotransposons deutlich effektiver, da vollständige LTR-Retrotransposons und dazwischen liegende DNA-Bereiche eliminiert werden (Abb. 4.1). Mit dem in pTS5 eingebetteten *Beetle1*-LTR (Hs1^{pro-1} Locus-DNA; Y12761) wurde ein Solo-LTR identifiziert, das von identischen TSDs flankiert wird. Diese homologen Sequenzwiederholungen resultieren aus einem Rekombinationsereignis innerhalb der LTR-Sequenzen eines *Beetle1*-Retrotransposon, da Rekombinationen zwischen unabhängigen LTR-Retrotransposons durch unterschiedliche flankierende Sequenzen gekennzeichnet sind (Vitte & Panaud, 2005).

Mit den Primern *Beetle1_PPT* for und *Beetle1_PBS* rev wurde ein *Beetle1*-LTR amplifiziert, kloniert und sequenziert, der von einem Polypurintrakt und einer Primerbindungsstelle flankiert im *B. procumbens*-Genom vorliegt. Sowohl PPT als auch PBS waren für die *Beetle1*-Familie charakteristisch. Solche aus der Rekombination zwischen LTRs

unterschiedlicher LTR-Retrotransposons resultierenden Derivate wurden von Devos *et al.* (2002) und Ma *et al.* (2005) in *Arabidopsis thaliana* und Mais beschrieben. Nur 2 % der in *Arabidopsis thaliana* analysierten Retrotransposon-Sequenzen gingen aus Rekombinationen zwischen heterogenen LTR-Retrotransposons hervor (Devos *et al.*, 2002)

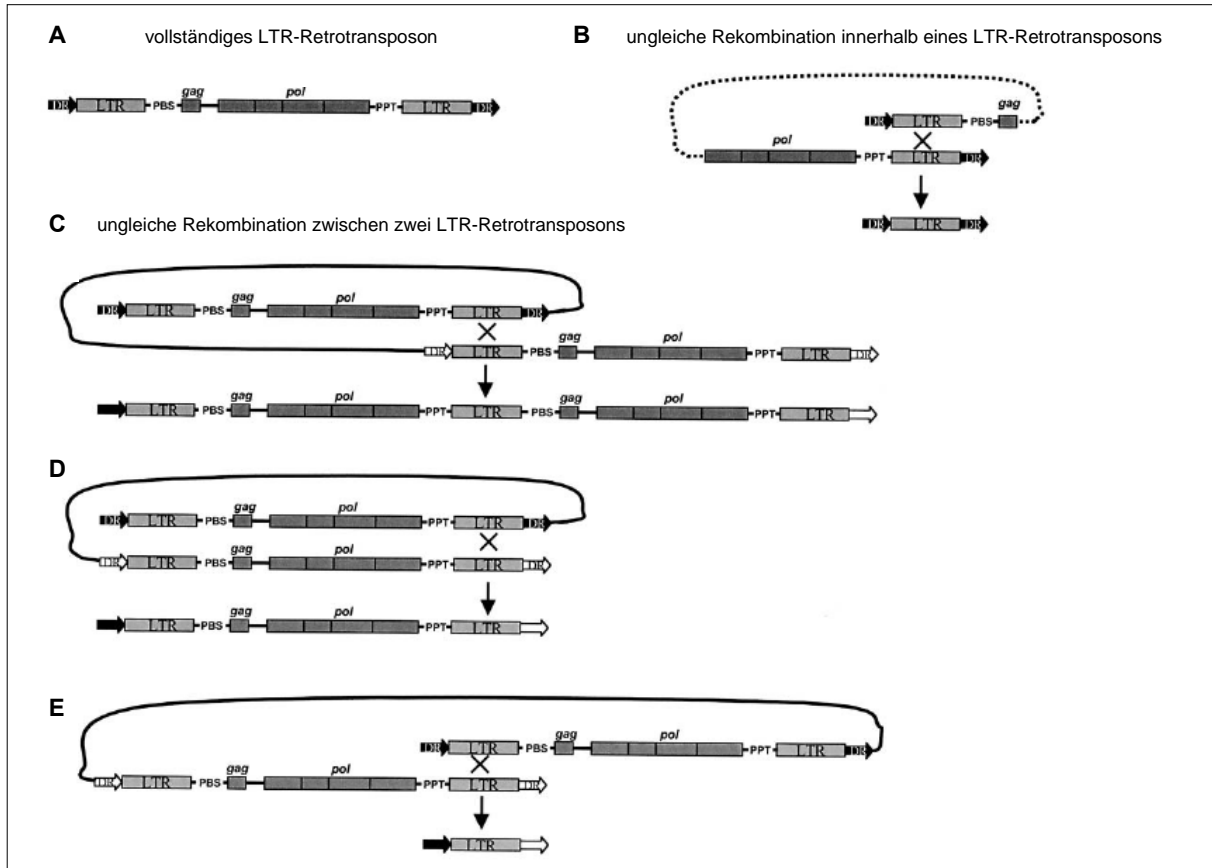


Abb. 4.1 Ungleiche homologe Rekombination zwischen LTR-Retrotransposons (modifiziert nach Devos *et al.*, 2002) Die gepunktete Linie dient der Veranschaulichung der Strangfaltung und stellt keine DNA dar. Die durchgehende schwarze Linie repräsentiert die zwischen den beiden LTR-Retrotransposons liegenden DNA-Sequenzen, die durch die Rekombination deletiert werden. A) Struktur eines vollständigen LTR-Retrotransposons mit direkten Wiederholungen (DR) der flankierenden DNA. B) Die Rekombination innerhalb eines Retrotransposons resultiert im Verbleib eines Solo-LTRs. C) Rekombinantes LTR-Retrotransposon, dass aus der Rekombination zwischen 3'-LTR und 5'-LTR zwei benachbarter Retrotransposon resultiert. D) Ein „vollständiges“ Retrotransposon ohne TSDs resultiert aus der ungleichen Rekombination zwischen zwei 5'-LTRs, zwei 3'-LTRs oder der internen Region beider Retrotransposons. E) Ein „Solo“-LTR ohne TSD resultiert aus der Rekombination zwischen 3'- und 5'-LTRs von zwei Retrotransposons.

Resultate aus ungleicher homologer Rekombination sind vielfach für Pflanzen beschrieben. Dabei scheinen diese Mechanismen in unterschiedlicher Intensität aufzutreten. Während Mais hauptsächlich intakte Retroelemente enthält und selten Solo-LTRs aufweist (SanMiguel *et al.*, 1998), liegt das Verhältnis zwischen Solo-LTRs und intakten Retrotransposons in *Arabidopsis thaliana* bei 1:1 (Devos *et al.*, 2002). Gerste mit einem doppelt so großen Genom wie Mais (Arumuganathan & Earle, 1991) besitzt 16-mal mehr Solo-LTRs von *BARE-1* als dessen interne Domänen (Vicient *et al.*, 1999; Shirasu *et al.*, 2000). Vitte & Panaud (2003)

zeigten in Reis das abundante Vorkommen von Solo-LTRs in drei untersuchten *Metaviridae*-Familien, wobei das Verhältnis von Solo-LTR zu vollständigen Kopien zwischen den Retrotransposon-Familien stark variiert. Das hohe Verhältnis von Solo-LTRs zu intakten Retrotransposons innerhalb des funktionellen Bereichs des Centromers von Chromosom 8 (Nagaki *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004) weist auf ungleiche Rekombination innerhalb eines Retrotransposons in den Centromer-Regionen von Reis hin (Ma & Jackson, 2006).

In einzelnen Kopien von *Beetle1* und *Beetle2* wurden durch PCR mit den PBS/PPT-Primern Deletionen innerhalb der internen Retrotransposon-Sequenzen festgestellt. Das Auftreten solcher Deletionen in LTR-Retrotransposons (Wicker *et al.*, 2001; 2003) spricht für einen von der homologen Rekombination unabhängigen Mechanismus, der in Pflanzen eine wichtige Rolle in der DNA-Eliminierung einnimmt (Vitte & Panaud, 2005). Deletionen zwischen den LTRs eines Retrotransposons resultieren aus illegitimen Rekombinationsprozessen.

Für ein *Beetle1*-Derivat (*Beetle1*Δ) wurde eine Deletion von 1572 bp im Bereich zwischen Reverser Transkriptase und Integrase ermittelt. Deletionen in transponierbaren Elementen wurden auch in Mais und Weizen beobachtet (Marillonnet & Wessler, 1998; Wicker *et al.*, 2001). In Reis wurden in der Analyse von drei mittelrepetitiven Retrotransposonfamilien Deletionen ermittelt, die von 10 bis 3007 bp rangieren (Ma *et al.*, 2004). Die überwiegende Anzahl der LTR-Retrotransposons in *Arabidopsis thaliana* weist Deletionen auf, die mehr als 50 % des vollständigen Retrotransposons umfassen (Devos *et al.*, 2002). Bennetzen *et al.* (2005) vermuten, dass diese Derivate aus vielen unabhängigen Rekombinationsereignissen hervorgegangen sind. Interne Deletionen und degenerierte Retrotransposonderivate in der Centromer-Region des Chromosoms 12 der Tomate wurden von Yang *et al.* (2005) beschrieben.

Detaillierte Untersuchungen ergaben, dass die meisten Deletionen mit kurzen flankierenden Sequenzwiederholungen in einem Größenbereich von 2 bis 15 bp verbunden sind (Devos *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004; Ma & Bennetzen, 2004; Bennetzen *et al.*, 2005). Mit einer fünf Basenpaar umfassenden Wiederholung lässt sich der flankierende Sequenzbereich der Deletion in der *Beetle1*Δ-Kopie in diesen Kontext einordnen.

Fehler während der DNA-Replikation und die Reparatur von Doppelstrangbrüchen werden als Auslöser illegitimer Rekombinationsereignisse in Betracht gezogen (Vitte & Panaud, 2005). Kirik *et al.* (2000) zeigten, dass die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in *Arabidopsis thaliana* und Tabak zu Deletionen führen. Die Ligation der DNA-Stränge erfolgt dabei häufig an kurzen Sequenzwiederholungen und führt zur Entfernung von wenigen Basenpaaren bis

hin zu mehreren Megabasenpaaren (Devos *et al.*, 2002). Unterschiede in den Reparaturmechanismen von Doppelstrangbrüchen innerhalb der Arten könnten somit zu Differenzen in der Genomgröße beigetragen haben (Wicker *et al.*, 2003; Puchta, 2005).

Die Mechanismen zur Entfernung von DNA-Sequenzen stehen der Genomexpansion gegenüber. Die illegitime Rekombination stellt in *Arabidopsis thaliana* die treibende Kraft in der Verringerung der Genomgröße dar, da hierbei mindestens fünfmal mehr DNA als durch ungleiche homologe Rekombination entfernt wurde (Devos *et al.*, 2002). Ma & Bennetzen (2004) schlussfolgerten, dass die konkurrierenden Prozesse von Insertion und ungleicher homologer Rekombination der LTR-Retrotransposons maßgeblich zur Variation der Genomgröße in der Gattung *Oryza* beigetragen haben. Die Frage, ob die Eliminierung von transponierbaren Elementen kontinuierlich erfolgt oder umfassende Rekombinationen nach zeitlich begrenzten massiven Retrotransposon-Amplifikationen eintreten, ist noch nicht eindeutig geklärt (Rabinowicz, 2000). Das große Ausmaß an Deletionen und die hohe Übereinstimmung zwischen einzelnen Kopien innerhalb einer Retrotransposon-Familie deuten auf eine Eliminierung der LTR-Retrotransposons gleich nach deren Insertion ins Genom (Vitte *et al.*, 2007).

Die Datierung von Amplifikations- und Reduktionsereignissen in Reis deutet auf die Amplifikation aktiver Kopien begleitende Formation von Solo-LTRs hin (Vitte & Panaud, 2003). Ma *et al.* (2004) zeigten, dass auf alle LTR-Retrotransposons in Reis die gleichen Mechanismen, unabhängig von deren Kopienzahl, wirken. Dabei wurden in den letzten acht Millionen Jahren vermutlich 40 % der LTR-Retrotransposons entfernt (Ma *et al.*, 2004). Die Analyse orthologer LTR-Retrotransposons in eng verwandten Arten könnte zur Abschätzung der Intensität dienen, mit der Rekombinationsmechanismen auf die verschiedenen Linien einwirken (Petrov, 2001; Vitte & Panaud, 2005).

4.7.2 Regulation der Aktivität transponierbarer Elemente

Da die Aktivität von transponierbaren Elementen ein erhöhtes Mutationspotential für das Wirtsgenom birgt, vor allem durch die Integration in essentielle Gene, bedarf es deren strikter Kontrolle (Kidwell, 2002; McDonald *et al.*, 2005). Eukaryotische Genome verfügen über verschiedene Mechanismen, die der gezielten Repression dieser DNA-Sequenzen dienen. Die Inaktivierung von Genen, einschließlich der transkriptionellen (*transcriptional gene silencing*; TGS) und posttranskriptionellen Regulation (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) spielt

eine wichtige Rolle in der Aktivitätskontrolle von transponierbaren Elementen (Buchon & Vaury, 2006).

TGS ist durch die Blockierung der Transkription gekennzeichnet, die häufig mit DNA-Methylierung und Chromatin-Modifikation in Verbindung steht (Lippman *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006). Eine veränderte Chromatin-Kondensation führen zur Etablierung eines heterochromatischen Zustands, der neben einer schlechteren Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie (Jenuwein & Allis, 2001) auch die Inaktivierung von Genen bewirkt (Robertson, 2002).

Alle bisher untersuchten Pflanzen zeigen einen hohen Grad an Cytosin-Methylierung, die auf transponierbare Elemente und Satelliten-DNA beschränkt ist (Rabinowicz *et al.*, 2003). Experimentell konnte die gezielte Methylierung von transponierbaren Elementen an Methyltransferase-defizienten *Arabidopsis thaliana*-Mutanten gezeigt werden. Die Hypomethylierung in der *ddm1*-Mutante führte unter anderem zur Reaktivierung des *CAC1*-Transposons (Miura *et al.*, 2001) und des transgenen *Ty1-copia*-Retrotransposons *Tto1*, das aus Tabak isoliert wurde (Hirochika *et al.*, 2000).

Im Pflanzengenom tritt die DNA-Methylierung sowohl in symmetrischen CpG-, oder CpNpG-Motiven als auch asymmetrischen Mustern auf (Finnegan *et al.*, 1998). *Beetle1* und *Beetle2* wurden mit den methylierungssensitiven Restriktionsenzymen *MspI* und *HpaII* hinsichtlich Methylierung untersucht. Die Methylierung beider LTR-Retrotransposons ist sehr hoch. Die Ansammlung hochmolekularer *MspI*- und *HpaII*-Fragmente resultiert aus den nicht zugänglichen Schnittstellen innerhalb von *Beetle1* und *Beetle2* und der mit den *Beetle*-Retrotransposons verknüpften DNA-Region in *B. procumbens*.

Lediglich das Auftreten eines klar abgrenzbaren *MspI*-Fragmentes nach Hybridisierung mit *Beetle1*-Sonden weist auf einen anderen Methylierungsstatus einzelner *Beetle1*-Sequenzen hin. Die Variation in der Methylierung des internen Cytosins in der CCGG-Sequenz wurde bereits für Ty3-gypsy-Retrotransposons aus der Ölpalme beschrieben (Kubis *et al.*, 2003). In der Centromer-Region von *Arabidopsis thaliana*-Chromosomen wurde zudem eine strangspezifische Methylierung diagnostiziert (Luo & Preuss, 2003). Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass ein stromaufwärts gelegenes Retrotransposon, welches zur konstitutiven Expression des Agouti-Proteins führt, Unterschiede in der Methylierung aufweisen kann (Whitelaw & Martin, 2001). Dieses führt zur unterschiedlichen Repression des Agouti-Gens und es kommt zu Variationen in der Fellfarbe genetisch identischer Mäuse (Whitelaw & Martin, 2001).

Die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme *MspI* und *HpaII* ist in der *Beetle1*-Sequenz an zwei Positionen (1587, 5407) vorhanden. Ein Restriktionsfragment mit einer Größe von 3820 bp würde aus einer Restriktion an diesen beiden Schnittorten resultieren. Nach Southern-Hybridisierung wäre dieses Fragment mit Sonden aller Domänen des *gag-pol*-Polyproteins detektierbar. Sowohl die UTR als auch die LTR-Bereiche von *Beetle1* wären nicht auf dem Restriktionsfragment enthalten. Die Detektion eines *MspI*-Fragmentes in den *Beetle1*-Domänen für die *gag*, Protease, RT, RNaseH und Integrase und die Abwesenheit eines äquivalenten Hybridisierungssignals innerhalb der UTR und dem *Beetle1*-LTR sprechen für solch eine Konstellation. Mit mehr als 5,5 kb weist das *MspI*-Fragment jedoch einen erheblichen Größenunterschied zum postulierten 3820 bp-Fragment auf. Diese Abweichung deutet auf eine komplexe Strukturierung von *Beetle1*-Sequenzen im Genom hin. Eine große Bandbreite an strukturellen Variationen von Retrotransposons, die von Nukleotidsubstitutionen und kleinen Insertionen/Deletionen bis zu großen Umlagerungen reichen, konnten ebenfalls in Mais, Reis und *Arabidopsis thaliana* beobachtet werden (Messing *et al.*, 2004; Bennetzen *et al.*, 2005; Ma & Bennetzen, 2006).

Im vorangegangenen Abschnitt wurde auf die Blockierung der Transkription transponierbarer Elemente durch DNA-Methylierung eingegangen. Untersuchungen der letzten Jahre sprechen dabei der doppelsträngigen RNA (dsRNA) eine besondere Bedeutung in der Stilllegung von Genen und transponierbaren Elementen zu. Durch die Vermittlung mehrerer Funktionen besitzt sie einerseits die Fähigkeit *de novo* Methylierungen homologer Sequenzen im Nukleus zu beeinflussen (Mette *et al.*, 2000; Wassenegger, 2000), andererseits induziert sie einen sequenzspezifischen Degradationsprozess, der zum PTGS führt. Hierbei wird dsRNA durch ein RNaseIII-ähnliches Enzym (Dicer) in kurze RNA (*small interfering* RNA, siRNA) gespalten, die zur Degradation der homologen mRNA-Sequenzen führt (Boeke & Stoye, 1997). Solch ein durch sequenzspezifische dsRNA induziertes *gene silencing* wird auch als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. In vielen Eukaryoten konnte nachgewiesen werden, dass die posttranskriptionelle RNA-Degradation zur Stilllegung transponierbarer Elemente führt (Schromke & Allshire, 2003; Volpe *et al.*, 2003). Eine Suppression transponierbarer Elemente durch RNA-Interferenz wurde in Mais anhand des sehr aktiven MuDR-Transposons demonstriert (Slotkin *et al.*, 2005). Die zusätzliche Präsenz einer natürlich vorkommenden invertierten unvollständigen MuDR-Duplikation ermöglicht die Ausbildung von dsRNA, die zur mRNA-Degradation und RNA-abhängigen DNA-Methylierung führt (Slotkin *et al.*, 2005).

4.8 *Beetle1* und *Beetle2* - funktionelle Komponenten des *B. procumbens*-Centromers?

Centromere sind hochspezialisierte Strukturen aller eukaryotischer Chromosomen, welche für die korrekte Transmission der genetischen Information von Zelle zu Zelle und von Generation zu Generation notwendig sind. Sie sind zuständig für den Zusammenhalt der Schwester-Chromatiden und die Ausbildung des Kinetochors, an dem nach Anlagerung weiterer Proteine die Mikrotubuli des Spindelapparates ansetzen. (Houben & Schubert, 2003; Jiang *et al.*, 2003) Die Centromere höherer Eukaryoten sind sehr komplex strukturiert und werden meist aus repetitiver DNA gebildet, die als Heterochromatin auch mikroskopisch erkennbar ist (Choo, 2001).

Neben tandemartig angeordneten Satelliten stellen LTR-Retrotransposons eine Hauptkomponente in pflanzlichen Centromeren dar (Murata, 2002; Houben & Schubert, 2003; Jiang *et al.*, 2003). Centromerische Retrotransposons (*centromeric retrotransposon*; CR) sind in Mais (*centromeric retrotransposon of maize*, CRM), Reis (*centromeric retrotransposon of rice*, CRR), Gerste (*cereba*) und Zuckerrohr (*centromeric retrotransposon of sugarcane*, CRS) umfassend charakterisiert (Hudakova *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Nagaki *et al.*, 2003a; Jin *et al.*, 2004b; Nagaki & Murata, 2005). *Beetle1* und *Beetle2* besitzen mit Werten von über 60 % auf DNA-Ebene und bis zu 70 % auf Aminosäure-Ebene innerhalb verschiedener Regionen des *gag-pol*-Polyproteins deutlich höhere Homologien zu diesen CR-Elementen als zum Ty3-gypsy-Retrotransposon *dell-46* aus der Lilie, welches nicht am Centromer lokalisiert ist. Hier liegt die Homologie in der am höchsten konservierten Region der Reversen Transkriptase nur bei 49 % auf Aminosäure-Ebene.

Für die centromerischen Retrotransposons aus der *Poaceae*-Familie wurde die Integration in centromerische Satelliten gezeigt (Cheng *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2004b; Hudakova *et al.*, 2001; Nagaki & Murata, 2005). *Beetle1* und *Beetle2* folgen diesem Muster, da sie ebenfalls dispers in centromerischen Satellitenblöcken vorliegen. Diese zwei nichthomologen Satelliten pTS5 und pTS4.1 sind für die Sektion *Procumbentes* spezifisch, wobei pTS4.1 eher als pericentromerisch einzustufen ist (Schmidt & Heslop-Harrison, 1996).

Die direkte Interspersion von *Beetle1* mit dem pTS5-Satelliten aus dem funktionellen Bereich des *B. procumbens*-Centromers (Gindullis *et al.*, 2001b) wurde über DNA-Sequenzierung, Southern-Hybridisierung sowie Dot-Blot nachgewiesen. FISH-Analysen lokalisierten *Beetle1* sowohl in der Centromer-Region des akrozentrischen PRO1-Minichromosoms (Gindullis *et al.*, 2001b), als auch an allen Centromeren von *B. procumbens*. In simultaner FISH wurde die

Kolokalisation von *Beetle1* und pTS5 verifiziert. Bereits Gindullis *et al.* (2001b) zeigten mit Multicolor-FISH an Pachytän-Chromosomen von *B. procumbens* die Kolokalisation des pTS5-Satelliten mit Ty3-gypsy-ähnlichen Sequenzen, deren vollständige Struktur unbekannt war. Der Homologievergleich zeigte eine deutliche Abgrenzung von *Beetle1* und *Beetle2* von diesen Ty3-gypsy-Sequenzen.

Beetle2 ist eine prominente DNA-Komponente in den PRO1-BACs der Klasse II. Diese Klasse zeichnet sich durch die Anwesenheit beider Satelliten-Familien aus und deckt den Übergangsbereich zwischen dem funktionellen Bereich des Centromers bestehend aus pTS5-Blöcken mit einer Gesamtlänge von ca. 215 kb und der flankierenden Region aus pTS4.1-Einheiten ab (Gindullis *et al.*, 2001b). PCR-Analysen zeigten die benachbarte Lage von einem *Beetle2*-LTR mit dem pTS4.1-Satelliten.

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde *Beetle2* am Centromer von einigen *B. procumbens*-Chromosomen lokalisiert. Dabei wurden nicht alle Centromere detektiert, zwei Chromosomen blieben ohne Signal und enthalten demzufolge keine Retrotransposons der *Beetle2*-Familie. Das durch FISH auch unikale Sequenzen in *Beta*-Chromosomen nachzuweisen sind (Desel *et al.*, 2001) zeugt von der Sensitivität dieser Technik. Kumekawa *et al.* (2001) fanden innerhalb der 12 Reis-Centromere eine variierende Kopienzahl von CRR-Elementen. Unterschiede in der Abundanz einzelner centromerischer DNA-Komponenten als auch der Organisation zwischen individuellen Centromer-Regionen scheinen eine Schlüsselrolle in der Differenzierung der Chromosomen während der Paarung und Segregation zu spielen (Gindullis *et al.*, 2001b).

Die Signalintensitäten nach FISH mit den LTR-Sonden lässt auf eine hohe Akkumulation der *Beetle1*- und *Beetle2*-Retrotransposons am Centromer schließen. Die LTR-Retrotransposons in Reis kommen im Vergleich mit den meisten nicht-centromerischen Regionen um das drei- bis vierfache erhöht in der Centromer-Region vor (Ma & Bennetzen, 2006). Feschotte & Wessler (2002) ermittelten, dass die CRR-Elemente zwar in ihrer Verteilung nicht ausschließlich auf die Centromer-Region beschränkt sind, dort jedoch signifikant angereichert vorliegen.

Dieses nicht zufällige Verteilungsmuster reflektiert nach Pereira (2004) die Selektion gegen mutagene Effekte durch Insertion in Gene. So könnte sowohl die Insertionspräferenz in einen bestimmten Chromatinstatus als auch der verlangsamte Prozess der Entfernung von LTR-Retrotransposons in diesen Regionen die Akkumulation von Retrotransposons in den meisten pflanzlichen Centromeren bewirkt haben (Ma & Bennetzen, 2006).

Der selektive Druck, der durch die Entwicklung solch eines Repressionssystems auf die LTR-Retrotransposons ausgeübt wurde und der damit verbundene stetige Konflikt mit dem Wirtsgenom könnte in der Entwicklung immer komplexerer regulatorischer Systeme resultiert haben (McDonald, 1999; 2005), die im Verlauf der Evolution zunehmend an funktioneller Bedeutung gewannen.

Die centromerische Histon H3-Variante CenH3 wird als Kernbereich des Centromers betrachtet, der die Verbindung zwischen centromerischer DNA und dem proteinösen Kinetochor-Komplex vermittelt (Malik & Henikoff, 2002; Houben & Schubert, 2003). Dabei definiert es die chromosomale Position der Kinetochorausbildung (Houben & Schubert, 2003) und ist zur Rekrutierung der Hauptkomponenten des Kinetochors ausreichend (Choo, 2001). CenH3 ist nur an aktiven Centromeren lokalisiert und bindet dort direkt an die DNA, womit es zur Untersuchung der DNA-Sequenzen, die für ein funktionelles Centromer notwendig sind, eingesetzt werden kann (Nagaki & Murata, 2005).

Für centromerische Satelliten wurde in vielen bisher untersuchten Pflanzenarten die Interaktion mit CenH3 durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) gezeigt (Zhong *et al.*, 2002; Nagaki *et al.*, 2003b; 2004; Nagaki & Murata, 2005; Houben *et al.*, 2007). Indes interagierten nur in Mais, Reis, Zuckerrohr und Gerste zusätzlich centromerische Retrotransposons mit CenH3 (Zhong *et al.*, 2002; Nagaki *et al.*, 2004; Nagaki & Murata, 2005; Houben *et al.*, 2007). Diese Ty3-gypsy-Retrotransposons stellen demnach funktionelle Komponenten dieser Centromere dar.

Aufgrund der Eigenschaften von *Beetle1*, wie der Anwesenheit und hohen Abundanz an allen *B. procumbens*-Centromeren, der signifikanten Homologie zu den CR-Elementen als auch der Interspersion mit dem centromerischen pTS5-Satelliten ist für dieses Ty3-gypsy-Retrotransposon eine funktionelle Rolle an den Centromeren von *B. procumbens* durchaus vorstellbar. *Beetle2* wäre hinsichtlich einer Funktion am Centromer unspezifischer nach *Beetle1* einzuordnen, da diese Ty3-gypsy-Familie wahrscheinlich nicht in allen *B. procumbens*-Centromeren vorliegt und seine chromosomale Lokalisation in der pericentromerischen Region einzuordnen ist.

Eine funktionelle Bedeutung der beiden LTR-Retrotransposons am Centromer kann nur experimentell geklärt werden. Durch ChIP könnten die DNA-Sequenzen des *B. procumbens*-Centromers identifiziert werden, die direkt mit CenH3 interagieren. Jedoch wurde ein für *Beta* spezifisches CenH3 bisher nicht isoliert.

Untersuchungen, die sich auf die Transmission künstlicher Pflanzenchromosomen (*plant artificial chromosome*, PAC) stützen, könnten die Charakterisierung funktioneller Komponenten in pflanzlichen Centromeren erheblich erleichtern (Hall *et al.*, 2004). Zudem würden nach Hall *et al.* (2004) Versuche mit PACs zur Aufklärung der Rolle von Centromergröße, Sequenzzusammensetzung und centromerbindenden Proteinen während der Meiose und Mitose beitragen.

Trotz der konservierten Centromer-Funktion variiert die DNA am Centromer bezüglich ihrer Sequenz, der Organisation und Komplexität (Jiang *et al.*, 2003; Lamb & Birchler, 2003; Henikoff & Dalal, 2005). Sowohl eine schnelle Sequenzevolution als auch der Umstand, dass Centromere einer Art in einigen Fällen in verwandten Arten funktionell sind (Jin *et al.*, 2004a), lässt eine epigenetische Regulation der Etablierung des Centromerstatus vermuten (Topp *et al.*, 2004). Die Ausbildung pflanzlicher Neocentromere ohne die Anwesenheit bekannter centromerischer Sequenzen (Nasuda *et al.*, 2005) und auch der Nachweis, dass nur ein geringer Teil der centromerischen Sequenzen mit CenH3 interagiert (Jin *et al.*, 2004a; Nagaki *et al.*, 2004; Shibata & Murata, 2004; Nagaki & Murata, 2005; Houben *et al.*, 2007), unterstützt diese Annahme.

Führen eine RNA-vermittelte DNA-Methylierung und Histonmodifikation zu einer Chromatinorganisation, die für die korrekte Verteilung der Chromosomen bei der Zellteilung erforderlich ist? Volpe *et al.* (2002) demonstrierten, dass RNA-Interferenz (RNAi) zur Etablierung des heterochromatischen Status in der pericentromerischen Region von *Schizosaccharomyces pombe*-Chromosomen notwendig ist. Zudem zeigte die Expression transponierbarer Elemente in Demethyltransferase (DDM1)-defizienten *Arabidopsis thaliana*-Mutanten die Verbindung von transponierbaren Elementen und siRNAs mit CenH3 und DNA-Methylierung (Lippman *et al.*, 2004). Durch die Rolle, die siRNAs in der gezielten Methylierung von transponierbaren Elementen einnehmen (Lindroth *et al.*, 2004), verursacht die Transkription transponierbarer Elemente auch deren heterochromatische Modifikation. Infolgedessen scheint centromerischer RNA eine epigenetische Schlüsselrolle in der Etablierung der spezifischen Chromatinorganisation zuzukommen (Dawe, 2003; Ekwall, 2004). Volpe *et al.* (2002) demonstrierte, dass Mutationen in der RNAi-Maschinerie in der Spaltheife bis zu Defekten in der Chromosomensegregation führen.

Luo & Preuss (2003) entdeckten in *Arabidopsis thaliana*, dass die Centromer-Region ausnahmslos strangspezifischer Methylierung unterworfen ist. Diese spezifische Modifikation des Centromers lässt die Ausbildung eines epigenetischen Signals zur Bindung von CenH3

und somit zur Formation des Kinetochors in dieser Region vermuten (Luo & Preuss, 2003). Durch diese selektive Methylierung wäre die Transkription einzelner transponierbarer Sequenzen am Centromer erst möglich und schließlich die Aufrechterhaltung des Chromatinstatus am Centromer gewährleistet. Sowohl in *B. procumbens* als auch in PRO1 wurden *Beetle1*-Sequenzen ermittelt, die einen verminderten Methylierungsgrad aufweisen. Weiterhin belegten die cDNA-Analysen das Vorkommen von *Beetle1*- und *Beetle2*-Transkripten. Die Struktur des analysierten Reis-Centromers 4 lässt vermuten, dass bereits die Anwesenheit eines intakten LTR-Retrotransposons und einer definierten, bisher ungeklärten Länge an Satelliteneinheiten für den Erhalt eines funktionellen Centromers ausreichend sind (Zhang *et al.*, 2004).

Jiang *et al.* (2003) vermutet, dass es sich bei der Integration von CenH3 in die Centromer-Nukleosomen um einen transkriptionsabhängigen Vorgang handelt. Eine DNA-Transkription in der mit CenH3-assoziierten Chromatinregion wurde für die Centromere der Reis-Chromosomen 8 und 3 beschrieben (Nagaki *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Die Auswertung der BAC-Endsequenzen der centromerischen PRO1-BACs ermittelte zwei Endsequenzen die signifikante Homologien zu eukaryotischen Genen, die für eine RNA-Polymerase und eine Fettsäure-Desaturase kodieren, zeigen. Topp *et al.* (2004) wiesen in Mais Transkripte von CRM-Elementen und dem CentC-Satelliten nach, welche mit CenH3 interagieren. Dabei rangierte die immunpräzipitierte RNA in einem Größenbereich von 40 bis 200 Basenpaaren, was für siRNA-Moleküle deutlich zu hoch liegt und eine Funktion in RNAi-vermittelten Mechanismen ausschließt (Topp *et al.*, 2004).

Eine Affinität centromerischer RNAs zu chromatinmodifizierenden Proteinen und anderen Kinetochorproteinen vorausgesetzt, könnte die centromer-assoziierte RNA die Rekrutierung der für die Kinetochorausbildung notwendigen Proteine in die Centromerbereiche unterstützen und somit die Segregation fördern (Jiang *et al.*, 2003). Dabei wäre nach Topp *et al.* (2004) durchaus die Ausbildung eines flexiblen Gerüsts aus centromerischer RNA denkbar, welches das Zusammenführen als auch die Stabilisierung der Proteine des Kinetochors vermittelt. Jüngste Untersuchungen belegen die funktionelle Rolle der RNA des α -Satelliten bei der Anlagerung centromerspezifischer Nucleoproteine am Nucleolus und Centromer (Wong *et al.*, 2007). Sollte demnach RNA eine wichtige funktionelle Rolle im Erhalt des Centromerstatus zukommen, wäre weniger die DNA-Sequenz sondern die Sekundärstruktur der daraus resultierenden gefalteten RNA für die Funktionalität ausschlaggebend (Topp *et al.*, 2004).

5 Zusammenfassung

Die Gattung *Beta* gehört zur Familie der *Chenopodiaceae* und wird in die vier Sektionen *Beta*, *Corollinae*, *Nanae* und *Procumbentes* unterteilt, wobei die Zuckerrübe der Sektion *Beta* zugeordnet wird. Aus dem Genom der Zuckerrübe und verwandter Wildarten konnten bereits eine Vielzahl von repetitiven DNA-Familien kloniert und untersucht werden. Allerdings blieben Sequenzen vollständiger LTR-Retrotransposons bisher unerforscht. Daraus ließ sich das Ziel der vorliegenden Arbeit ableiten, das in der Isolation und molekularen Charakterisierung von Ty3-gypsy-Retrotransposons aus der Centromer-Region eines Chromosomenfragments in *Beta vulgaris* L. bestand.

Mit der monosomen Fragmentadditionslinie PRO1 stand eine Chromosomenmutante zur Verfügung, die neben den 18 *B. vulgaris*-Chromosomen ein Chromosomenfragment der Wildrübe *B. procumbens* enthält. Da dieses als Minichromosom bezeichnete Fragment mitotische Stabilität aufweist, muss es ein funktionelles Centromer besitzen, das auch im genetischen Hintergrund von *B. vulgaris* aktiv ist. Mit der Erstellung einer BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Bank von PRO1 wurde die molekulare Charakterisierung von Ty3-gypsy-Retrotransposons eines einzelnen Wildrüben-Centromers möglich. Die für die Wildrübe *B. procumbens* spezifischen Satellitenrepeats pTS5 und pTS4.1 dienten der Selektion von BACs aus der Centromer-Region des PRO1-Minichromosoms.

Die Untersuchung der Kandidaten-BACs offenbarte neben einer komplexen Organisation von LTR-Retrotransposons das Vorkommen deletierter und rearrangierter Retrotransposon-Sequenzen, was die Identifizierung vollständiger Kopien erschwerte. Die Identifizierung eines unikaligen genomischen Locus, der aus zwei nicht homologen LTR-Retrotransposons besteht indem ein Retrotransposon in das andere transponiert ist, ermöglichte die gerichtete Isolation von zwei definierten LTR-Retrotransposons. Diese wurden *Beetle1* und *Beetle2* benannt.

Das Retrotransposon *Beetle1* hat eine Gesamtlänge von 6736 bp und wird von LTR-Sequenzen begrenzt, die eine Länge von 1091 bp (5'-LTR) bzw. 1089 bp (3'-LTR) aufweisen. Das LTR-Retrotransposon *Beetle2* weist mit 6690 bp eine ähnliche Gesamtlänge wie *Beetle1* auf. Es wird von deutlich kürzeren LTR-Sequenzen mit einer Länge von 774 bp begrenzt.

Aufgrund der Reihenfolge der Polyproteingene lassen sich *Beetle1* und *Beetle2* in die Gruppe der Ty3-gypsy-Retrotransposons (*Metaviridae*) einordnen. Beide Retrotransposon-Familien besitzen ein einziges offenes Leseraster (*open reading frame*; ORF) mit fusionierten gag- und

pol-Genen. Sowohl *Beetle1* als auch *Beetle2* zeichnen sich dabei durch Gene für das *gag-pol*-Polyprotein aus, die bis in den 3'-LTR hinein reichen, wobei *Beetle2* mehrere Wechsel im Leseraster aufweist. Zwar weisen *Beetle1* und *Beetle2* im *gag-pol*-Polyprotein Homologien zwischen 50,9 % und 73 % auf, so lassen sie sich durch die nicht homologen LTR-Sequenzen zweifelsfrei als eigenständige *Beetle*-Familien definieren.

Besonders auffällig ist die große Übereinstimmung von *Beetle1* und *Beetle2* mit den centromerischen Ty3-gypsy-Retrotransposons CRM aus *Zea mays*, CRR aus *Oryza sativa* und *cereba* aus *Hordeum vulgare*. Diese centromerischen Retrotransposons (CRs) sind in den *Poaceae* stark konserviert und stellen neben Satellitenrepeats eine hochabundante Sequenzklasse der Centromere der Süßgräser dar. Da sie im 3'-Bereich des *gag-pol*-Polyproteins eine Chromodomäne aufweisen, werden sie der eigenständigen Gruppe der Chromoviren zugeordnet. Chromodomänen sind zur Bindung von Proteinen und DNA befähigt und spielen eine wichtige Rolle in der Chromatin-Modifikation und der Bildung von Heterochromatin-Regionen. *Beetle1* und *Beetle2* besitzen Motive einer Chromodomäne, die vermutlich für eine gerichtete Transposition in die Centromer-Region verantwortlich ist. Neben der geringen Divergenz von *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen sowohl im Genom von *B. procumbens* als auch in den anderen Arten der Sektion *Procumbentes* spricht auch das junge Alter von 100 000 bis 350 000 Jahren für eine Einordnung dieser Ty3-gypsy-Retrotransposons in die Gruppe der Chromoviren.

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit Metaphase-Chromosomen wurde die chromosomale Organisation von *Beetle1* und *Beetle2* untersucht. Die für die jeweilige *Beetle*-Familie charakteristische LTR-Sequenz lokalisierte beide Retrotransposons am Centromer von *B. procumbens*-Chromosomen. *Beetle1* markiert alle *B. procumbens*-Centromere, wogegen *Beetle2* nicht an allen Centromeren und auch nicht allen Chromosomen von *B. procumbens* nachweisbar ist. Beide *Beetle*-Elemente sind jedoch spezifisch für das Minichromosom. Diese Amplifikation am Centromer einer Minichromosoms ist artübergreifend, da sie auch in einer anderen monosomen Additionslinie (PAT2), die ein Chromosomenfragment aus der Wildrüse *Beta patellaris* enthält, nachgewiesen werden konnte.

Sowohl die Southern-Analyse als auch die FISH zeigten, dass *Beetle1* und *Beetle2* nur für die Sektion *Procumbentes* spezifisch sind und dort in hoher Kopienzahl vorkommen. Untersuchungen mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen veranschaulichten den hohen Grad an Cytosin-Methylierung von *Beetle1* und *Beetle2*.

Obwohl bisher nur für drei pflanzliche LTR-Retrotransposons die Transpositionsaktivität gezeigt werden konnte, ist die Transkription von Retroelementen die Voraussetzung für deren Transposition. Die RT-PCR resultierte in der Amplifikation von *Beetle1*- und *Beetle2*-Sequenzen, die in ihrer Sequenz nur geringfügig von den charakterisierten Kopien abwichen und kein internes Stopcodon aufwiesen. Dieses Ergebnis lässt auf die Transkriptionsaktivität von *Beetle1*-und *Beetle2*-Kopien im Genom von *B. procumbens* schließen.

Basierend auf den ermittelten Ergebnissen könnte für *Beetle1* eine Funktion am Centromer vermutet werden, wobei diese These experimentell bestätigt werden muss. Zusammenfassend stellen *Beetle1* und *Beetle2* wichtige strukturelle DNA-Komponenten der Centromer-Region von *Procumbentes*-Arten dar.

6 LITERATUR

- Adams, M. *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287** (5461): 2185-2195.
- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers and D. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215** (3): 403-410.
- Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25** (17): 3389-3402.
- Alwine, J., D. Kemp and G. Stark (1977). Method of detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5350-5354.
- Ansari, K., S. Walter, J. Brennan, M. Lemmens, S. Kessans, A. McGahern, D. Egan and F. Doohan (2007). Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and non-mycotoxigenic-associated Fusarium stress. *Theor Appl Genet* **114** (5): 927-937.
- Arumuganathan, K. and E. Earle (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* **9** (3): 208-218.
- Avramova, Z., A. Tikhonov, P. SanMiguel, Y. Jin, C. Liu, S. Woo, R. Wing and J. Bennetzen (1996). Gene identification in a complex chromosomal continuum by local genomic cross-referencing. *Plant J* **10** (6): 1163-1168.
- Avramova, Z. (2002). Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiol* **129** (1): 40-49.
- Baker, T. and L. Luo (1994). Identification of residues in the Mu Transposase essential for catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (14): 6654-6658.
- Balint-Kurti, P. (2000). Identification and chromosomal localization of the monkey retrotransposon in *Musa sp.*. *Mol Gen Genet* **263**(6): 908-915.
- Barocka, K. (1985). Zucker-und Futterrüben. *Lehrbuch der Pflanzenzüchtung landwirtschaftlicher Kulturformen*, Bd **2**: 245-287.
- Beguiristain, T., M. A. Grandbastien, P. Puigdomenech and J. M. Casacuberta (2001). Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant Physiol* **127** (1): 212-21.
- Bennetzen, J. and E. Kellogg (1997). Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? *Plant Cell* **9**: 1509-1514.
- Bennetzen, J., P. SanMiguel, M. Chen, A. Tikhonov, M. Francki and Z. Avramova (1998). Grass genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (5): 1975-1978.
- Bennetzen, J. (2000). Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol* **42** (1): 251-269.
- Bennetzen, J. (2002). Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. *Genetica* **115** (1): 29-36.
- Bennetzen, J., J. Ma and K. M. Devos (2005). Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann Bot* **95** (1): 127-132.

- Bernstein, E and C. Allis (2005). RNA meets chromatin. *Genes Dev* **19**: 1635-1655
- Boeke, J. and V. Corces (1989). Transposition and Transcription of Retrotransposons. *Ann Rev Microbiol* **43**: 403-434.
- Boeke, J. and J. Stoye (1997). Retroviruses. In: Mobile DNA. Editor Berg D., M. Howe, *American Society for Microbiology*, Washington, DC, USA: 343-435.
- Bowen, N. and I. Jordan (2002). Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. *Curr Iss Mol Biol* **4**: 65-76.
- Brandes, A., C. Jung and G. Wricke (1987). Nematode resistance derived from wild beet and its meiotic stability in sugar beet. *Plant Breed* **99**: 56-64.
- Brown, T. A. (2002). Genomes 2. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK
- Buchon, N. and C. Vauray (2006). RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity* **96**: 195-202.
- Budiman, M., L. Mao, T. Wood and R. Wing (2000). A deep-coverage Tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Res* **10** (1): 129-136.
- Capy, P., C. Bazin, D. Higuier and T. Langin (1998). Dynamic and evolution of transposable elements. Editor *RG Landes Company*, Austin, Texas, USA
- Chavanne, F., D. Zhang, M. Liaud and R. Cerff (1998). Structure and evolution of Cyclops: a novel giant retrotransposon of the Ty3/Gypsy family highly amplified in pea and other legume species. *Plant Mol Biol* **37** (2): 363-375.
- Chen, M., G. Presting, W. Barbazuk, J. Goicoechea, B. Blackmon, G. Fang, H. Kim, D. Frisch, Y. Yu and S. Sun (2002). An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* **14**: 1-10.
- Cheng, Z., G. Presting, C. Buell, R. Wing and J. Jiang (2001). High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* **157** (4): 1749-1757.
- Cheng, Z., F. Dong, T. Langdon, S. Ouyang, C. R. Buell, M. Gu, F. R. Blattner and J. Jiang (2002). Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon. *Plant Cell* **14** (8): 1691-1704.
- Cheng, C., M. Daigen and H. Hirochika (2006). Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17. *Mol Genet Genomics* **276** (4): 378-390.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1): 156-159.
- Choo, K. (2001). Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev Cell* **1** (2): 165-177.
- Covey, S. (1986). Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res* **14** (2): 623-633.
- Curcio, M. and D. Garfinkel (1999). New lines of host defense: inhibition of Ty1 retrotransposition by Fus3p and NER/TFIIH. *Trends Genet* **15** (2): 43-45.

- Dawe, R. (2003). RNA interference, transposons, and the centromere. *Plant Cell* **15** (2): 297-301.
- Dawson, A., E. Hartwood, T. Paterson and D. Finnegan (1997). A LINE-like transposable element in *Drosophila*, the I factor, encodes a protein with properties similar to those of retroviral nucleocapsids. *EMBO J* **16**: 4448-4455.
- Dechyeva, D., F. Gindullis and T. Schmidt (2003). Divergence of satellite DNA and interspersion of dispersed repeats in the genome of the wild beet *Beta procumbens*. *Chromosome Res* **11** (1): 3-21.
- Dechyeva, D. and T. Schmidt (2006). Molecular organization of terminal repetitive DNA in *Beta* species. *Chromosome Res* **14** (8): 881-897.
- Desel, C., C. Jung, D. Cai, M. Kleine and T. Schmidt (2001). High-resolution mapping of YACs and the single-copy gene *Hs1pro-1* on *Beta vulgaris* chromosomes by multi-colour fluorescence in situ hybridization. *Plant Mol Biol* **45** (1): 113-22.
- Devos, K., J. Brown and J. Bennetzen (2002). Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Res* **12** (7): 1075-1079.
- Dimitri, P. and N. Junakovic (1999). Revising the selfish DNA hypothesis. *Trends Genet* **15**: 123-124.
- Dixit, A., K. Ma, J. Yu, E. Cho and Y. Park (2006). Reverse transcriptase domain sequences from Mungbean (*Vigna radiata*) LTR retrotransposons: Sequence characterization and phylogenetic analysis. *Plant Cell Rep* **25** (2): 100-111.
- Domingo, E. and J. Holland (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse S. The evolutionary biology of viruses. *Raven Press*, New York, USA: 161-164.
- Du, C., Z. Swigonova and J. Messing (2006). Retrotranspositions in orthologous regions of closely related grass species. *BMC Evol Biol* **6** (1): 62-73.
- Eckardt, N. (2004). Journey to the Center of the Genome: Complete Sequence of the Rice Chromosome 8 Centromere. *Plant Cell* **16** (4): 789-791.
- Eickbush, T. (1992). Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol* **4** (5): 430-440.
- Ekwall, K. (2004). The roles of histone modifications and small RNA in centromere function. *Chromosome Res* **12** (6): 535-542.
- Feinberg, A. and B. Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132** (1): 6-13.
- Feschotte, C., N. Jiang and S. Wessler (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* **3** (5): 329-341.
- Feschotte, C. and S. Wessler (2002). Mariner-like transposases are widespread and diverse in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (1): 280-285.
- Finnegan, E., R. Genger, W. Peacock and E. Dennis (1998). DNA methylation in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49** (1): 223-247.
- Fire, A., S. Xu, M. Montgomery, S. Kostas, S. Driver and C. Mello (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391** (6669): 806-811.

- Flavell, R., M. Bennett, J. Smith and D. Smith (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genetics* **12** (4): 257-269.
- Flavell, A., E. Dunbar, R. Anderson, S. Pearce, R. Hartley and A. Kumar (1992). Ty1-*copia* group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucleic Acids Res* **20** (14): 3639-3644.
- Fransz, P., J. De Jong, M. Lysak, M. Castiglione and I. Schubert (2002). Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (22): 14584-14589.
- Friant, S., T. Heyman, A. Bystrom, M. Wilhelm and F. Wilhelm (1998). Interactions between Ty1 retrotransposon RNA and the T and D regions of the tRNA(iMet) primer are required for initiation of reverse transcription in vivo. *Mol Cell Biol* **18** (2): 799-806.
- Fu, H. and H. Dooner (2000). A gene-enriched BAC library for cloning large allele-specific fragments from maize: Isolation of a 240-kb contig of the bronze region. *Genome Res* **10** (6): 866-873.
- Fu, H. and H. Dooner (2002). Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (14): 9573-9578.
- Garfinkel, D. (2005). Genome evolution mediated by Ty elements in *Saccharomyces*. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 63-9.
- Gaut, B., B. Morton, B. McCaig and M. Clegg (1996). Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (19): 10274-10279.
- Gaut, B. (2002). Evolutionary dynamics of grass genomes. *New phytologist* **154** (1): 15-28.
- Gindullis, F., D. Dechyeva and T. Schmidt (2001a). Construction and characterization of a BAC library for the molecular dissection of a single wild beet centromere and sugar beet (*Beta vulgaris*) genome analysis. *Genome* **44** (5): 846-855.
- Gindullis, F., C. Desel, I. Galasso and T. Schmidt (2001b). The large-scale organization of the centromeric region in *Beta* species. *Genome Res* **11** (2): 253-265.
- Goff, S. (2001). Retroviridae: The retroviruses and their replication. *Fields Virology* (4th edn) Lippincott, Philadelphia, USA: 1871-1939.
- Gorinšek, B., F. Gubensek and D. Kordis (2004). Evolutionary genomics of chromoviruses in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21** (5): 781-798.
- Gorinšek, B., F. Gubensek and D. Kordiš (2005). Phylogenomic analysis of chromoviruses. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 543-552.
- Götte, M., X. Li and M. Wainberg (1999). HIV-1 reverse transcription: A brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophysics* **365** (2): 199-210.
- Grandbastien, M. A., A. Spielmann and M. Caboche (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* **337**: 376-380.
- Grandbastien, M. A., C. Audeon, J. Casacuberta, P. Grappin, H. Lucas, C. Moreau and S. Pouteau (1994). Functional analysis of the tobacco Tnt1 retrotransposon. *Genetica* **93** (1): 181-189.

- Grandbastien, M. A., H. Lucas, J. Morel, C. Mhiri, S. Vernhettes and J. Casacuberta (1997). The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica* **100** (1-3): 241-252.
- Grandbastien, M. A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci* **3** (5): 181-187.
- Gribbon, B., S. Pearce, R. Kalendar, A. Schulman, L. Paulin, P. Jack, A. Kumar and A. Flavell (1999). Phylogeny and transpositional activity of Ty1-copia group retrotransposons in cereal genomes. *Mol Gen Genet* **261** (6): 883-891.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Hall, A., K. Keith, S. Hall, G. Copenhaver and D. Preuss (2004). The rapidly evolving field of plant centromeres. *Curr Opin Plant Biol* **7** (2): 108-114.
- Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell and D. Baulcombe (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* **21**: 4671-4679.
- Hansen, L. and S. Sandmeyer (1990). Characterization of a transpositionally active Ty3 element and identification of the Ty3 integrase protein. *J Virol* **64** (6): 2599-2607.
- Hansen, C. and J. S. Heslop-Harrison (2004). Sequences and phylogenies of plant pararetroviruses, viruses and transposable elements. *Adv Bot Res* **41**: 165-193.
- Havecker, E., X. Gao and D. Voytas (2004). The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol* **5** (6): Artikel 225.
- Henikoff, S. and Y. Dalal (2005). Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr Opin Genet Dev* **15** (2): 177-184.
- Heslop-Harrison, J. S. *et al.* (1997). The chromosomal distributions of Ty1-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* **100** (1-3): 197-204.
- Hirochika, H. (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J* **12** (6): 2521-2528.
- Hirochika, H. and R. Hirochika (1993). Ty1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn J Genet* **68** (1): 35-46.
- Hirochika, H., H. Otsuki, M. Yoshikawa, Y. Otsuki, K. Sugimoto and S. Takeda (1996a). Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon Tto1 in rice. *Plant Cell* **8** (4): 725-734.
- Hirochika, H., K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa and M. Kanda (1996b). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (15): 7783-7788.
- Hirochika, H., H. Okamoto and T. Kakutani (2000). Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the ddm1 mutation. *Plant Cell* **12** (3): 357-369.
- Hizi, A. and H. L. Levin (2005). The integrase of the long terminal repeat-retrotransposon Tf1 has a chromodomain that modulates integrase activities. *J Biol Chem* **280** (47): 39086-39094.
- Holmes, D. and M. Quigley (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114** (1): 193-197.

- Houben, A. and I. Schubert (2003). DNA and proteins of plant centromeres. *Curr Opin Plant Biol* **6** (6): 554-560.
- Houben, A., E. Schroeder-Reiter, K. Nagaki, S. Nasuda, G. Wanner, M. Murata. and T. Endo (2007). CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma* **116** (3): 275-283.
- Hudakova, S., W. Michalek, G. Presting, R. ten Hoopen, K. dos Santos, Z. Jasencakova and I. Schubert (2001). Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Res* **29** (24): 5029-5035.
- Hull, R. (2001). Classifying reverse transcribing elements: a proposal and a challenge to the ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* **146** (11): 2255-2261.
- Ilic, K., P. SanMiguel and J. Bennetzen (2003). A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (21): 12265-12270.
- Jacobs, S. and S. Khorasanizadeh (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295** (5562): 2080-2083.
- Jakubczak, J., Y. Xiong and T. Eickbush (1990). Type I (R1) and type II (R2) ribosomal DNA insertions of *Drosophila melanogaster* are retrotransposable elements closely related to those of *Bombyx mori*. *J Mol Biol* **212**(1): 37-52.
- James, T. and S. Elgin (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* **6** (11): 3862-3872.
- Jensen, S., M. Gassama and T. Heidmann (1999). Cosuppression of *I* transposon activity in *Drosophila* by *I*-containing sense and antisense transgenes. *Genetics* **153** (4): 1767-1774.
- Jenuwein, T. and C. Allis (2001). Translating the histone code. *Science* **293** (5532): 1074-1080.
- Jiang, J., B. Gill, G. Wang, P. Ronald and D. Ward (1995). Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** (10): 4487-4491.
- Jiang, N. and S. Wessler (2001). Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements. *Plant Cell* **13** (11): 2553-2564.
- Jiang, J., J. Birchler, W. Parrott and R. Dawe (2003). A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci* **8** (12): 570-575.
- Jin, W., J. Melo, K. Nagaki, P. Talbert, S. Henikoff, R. Dawe and J. Jiang (2004). Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell* **16** (3): 571-581.
- Jordan, I., I. Rogozin, G. Glazko and E. Koonin (2003). Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet* **19**: 68-72.
- Ju, G. and A. Skalka (1980). Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses: structural similarities with transposable elements. *Cell* **22**: 379-386.

- Jung, C. and G. Wricke (1987). Selection of diploid nematode resistant sugar beet from monosomic addition lines. *Plant Breed* **98**: 205-214.
- Kalendar, R., J. Tanskanen, S. Immonen, E. Nevo and A. Schulman (2000). Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (12): 6603-6607.
- Kapitonov, V. and J. Jurka (2001). Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (15): 8714-8719.
- Ketting, R., T. Haverkamp, H. van Luenen and R. Plasterk (2003). mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase and RNaseD. *Dev Cell* **5** (2): 337-350.
- Khan, E., J. Mack, R. Katz, J. Kulkosky and A. Skalka (1991). Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res* **19** (4): 851-860.
- Kidwell, M. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* **115** (1): 49-63.
- Kim, A., C. Terzian, P. Santamaria, A. Pelisson, N. Prud'homme and A. Bucheton (1994). Retroviruses in invertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (4): 1285-1289.
- Kim, J., M. Islam-Faridi, P. Klein, D. Stelly, H. Price, R. Klein and J. Mullet (2005). Comprehensive molecular cytogenetic analysis of *sorghum* genome architecture: distribution of euchromatin, heterochromatin, genes and recombination in comparison to rice. *Genetics* **171** (4): 1963-1976.
- Kirik, A., S. Salomon and H. Puchta (2000). Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *EMBO J* **19**: 5562-5566.
- Koch, M., B. Haubold and T. Mitchell-Olds (2000). Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (*Brassicaceae*). *Mol Biol Evol* **17**: 1483-1498.
- Koonin, E., S. Zhou and J. Lucchesi (1995). The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res* **23** (21): 4229-4233.
- Kordiš, D. (2005). A genomic perspective on the chromodomain-containing retrotransposons: Chromoviruses. *Gene* **347** (2): 161-173.
- Kubis, S., J. Heslop-Harrison and T. Schmidt (1997). A family of differentially amplified repetitive DNA sequences in the genus *Beta* reveals genetic variation in *Beta vulgaris* subspecies and cultivars. *J Mol Evol* **44** (3): 310-320.
- Kubis, S., T. Schmidt and J. S. Heslop-Harrison (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann Bot* **82**: 45-55.
- Kubis, S., A. Castilho, A. Vershinin and J. S. Heslop-Harrison (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Mol Biol* **52** (1): 69-79.

- Kulkosky, J., K. Jones, R. Katz, J. Mack and A. Skalka (1992). Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol* **12** (5): 2331-2338.
- Kumar, A. and J. Bennetzen (1999). Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* **33**: 479-532.
- Kumekawa, N., N. Ohmido, K. Fukui, E. Ohtsubo and H. Ohtsubo (2001). A new *gypsy*-type retrotransposon, RIRE7: preferential insertion into the tandem repeat sequence TrsD in pericentromeric heterochromatin regions of rice chromosomes. *Mol Genet Genomics* **265** (3): 480-488.
- Kunze, R., H. Saedler and W. Lönig (1997). Plant transposable elements. *Adv Bot Res* **27** (33): 1-470.
- Lamb, J. and J. Birchler (2003). The role of DNA sequence in centromere formation. *Genome Biol* **4** (5): Artikel 214.
- Langdon, T., C. Seago, M. Mende, M. Leggett, H. Thomas, J. Forster, R. Jones and G. Jenkins (2000). Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics* **156** (1): 313-325.
- Lange, W., W. Brandenburg and T. De Bock (1999). Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). *Botanical J Linnean Soc* **130** (1): 81-96.
- Lange, B. and G. Presting (2004). Genomic survey of metabolic pathways in rice. In: Romeo, J. (ed) *Rec Adv Phytochem*, Elsevier, Amsterdam: 111-137.
- Laten, H. (1999). Phylogenetic evidence for Ty1-*copia*-like endogenous retroviruses in plant genomes. *Genetica* **107** (1): 87-93.
- Laten, H., A. Majumdar and E. Gaucher (1998). SIRE-1, a *copia*/Ty1-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (12): 6897-902.
- Levy, A. and M. Feldman (2002). The Impact of Polyploidy on Grass Genome Evolution. *Plant Physiol* **130** (4): 1587-1593.
- Lindroth, A., D. Shultis, Z. Jasencakova, J. Fuchs, L. Johnson, D. Schubert, D. Patnaik, S. Pradhan, J. Goodrich and I. Schubert (2004). Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBO J* **23**: 4146-4155.
- Liolios, K., N. Tavernarakis, P. Hugenholtz, N. Kyrpides and O. Journals (2006). The genomes on line database (GOLD) v. 2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucleic Acids Res* **34**: Database issue D332-334.
- Lippman, Z., B. May, C. Yordan, T. Singer and R. Martienssen (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol* **1** (3): e67 DOI: 10.1371/journal.pbio.0000067.
- Lippman, Z., A. V. Grendel, M. Black, M. Vaughn, N. Dedhia, W. McCombie, K. Lavine, V. Mittal, B. May, K. Kasschau, J. Carrington, R. Doerge, V. Colot and R. Martienssen (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430** (6998): 471-476.
- Lorentz, A., K. Ostermann, O. Fleck and H. Schmidt (1994). Switching gene *swi6*, involved in repression of silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene* **143** (1): 139-43.

- Luo, S. and D. Preuss (2003). Strand-biased DNA methylation associated with centromeric regions in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (19): 11133-11138.
- Ma, J. and J. Bennetzen (2004). Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (34): 12404-12410.
- Ma, J., K. Devos and J. Bennetzen (2004). Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Res* **14** (5): 860-869.
- Ma, J., P. SanMiguel, J. Lai, J. Messing and J. Bennetzen (2005). DNA rearrangement in orthologous Orp regions of the maize, rice and sorghum. *Genetics* **170** (3): 1209-1220.
- Ma, J. and J. Bennetzen (2006). Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a centromeric region of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (2): 383-388.
- Ma, J. and S. Jackson (2006). Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice. *Genome Res* **16** (2): 251-259.
- Madlung, A. and L. Comai (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Ann Bot* **94** (4): 481-495.
- Mak, J. and L. Kleiman (1997). Primer tRNAs for reverse transcription. *J Virol* **71** (11): 8087-8095.
- Malik, H. and T. Eickbush (1999). Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR retrotransposons. *J Virol* **73** (6): 5186-5190.
- Malik, H., S. Henikoff and T. Eickbush (2000). Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res* **10** (9): 1307-1318.
- Malik, H. and T. Eickbush (2001). Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res* **11** (7): 1187-1197.
- Malik, H. and S. Henikoff (2002). Conflict begets complexity: the evolution of centromeres. *Curr Opin Genet Dev* **12** (6): 711-718.
- Matzke, M. and J. Birchler (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* **6**: 24-35.
- Marillonnet, S. and S. Wessler (1998). Extreme structural heterogeneity among the members of a maize retrotransposon family. *Genetics* **150** (3): 1245-1256.
- Marin, I. and C. Llorens (2000). Ty3/Gypsy retrotransposons: description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. *Mol Biol Evol* **17** (7): 1040-1049.
- Martienssen, R. (2003). Maintenance of heterochromatin by RNA interference of tandem repeats. *Nat Genet* **35** (3): 213-214.
- McCarthy, E., J. Liu, G. Lizhi and J. McDonald (2002). Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome Biol* **3** (10): research0053.1-0053.11.
- McClintock, B. (1949). Mutable loci in maize. *Year Book Carnegie Inst Washington* **48**: 142-154.
- McClintock, B. (1984). The Significance of Responses of the Genome to Challenge. *Science* **226** (4676): 792-801.

- McClure, M. (1991). Evolution of retroposons by acquisition or deletion of retrovirus-like genes. *Mol Biol Evol* **8**: 835-856.
- McDonald, J. (1999). Genomic imprinting as a coopted evolutionary character. *Trends Ecol Evol* **14** (9): 359.
- McDonald, J., M. Matzke and A. Matzke (2005). Host defenses to transposable elements and the evolution of genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 242-249.
- Meinkoth, J. and G. Wahl (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* **138** (2): 267-284.
- Menzel, G., D. Dechyeva, H. Keller, C. Lange, H. Himmelbauer and T. Schmidt (2006). Mobilization and evolutionary history of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in *Beta vulgaris* L.. *Chromosome Res* **14**(8): 831-844.
- Messing, J., A. Bharti, W. Karlowski, H. Gundlach, H. Kim, Y. Yu, F. Wei, G. Fuks, C. Soderlund, K. Mayer and R. Wing (2004). Sequence composition and genome organization of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (40): 14349-14354.
- Mette, M., W. Aufsatz, J. van der Winden, M. Matzke and A. Matzke (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* **19**: 5194-5201.
- Meyers, B., S. Tingey and M. Morgante (2001). Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Res* **11** (10): 1660-1676.
- Mhiri, C., J. B. Morel, S. Vernhettes, J. M. Casacuberta, H. Lucas and M. A. Grandbastien (1997). The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol Biol* **33** (2): 257-66.
- Miura, A., S. Yonebayashi, K. Watanabe, T. Toyama, H. Shimada and T. Kakutani (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* **411** (6834): 212-214.
- Miura, A., M. Kato, K. Watanabe, A. Kawabe, H. Kotani and T. Kakutani (2004). Genomic localization of endogenous mobile CACTA family transposons in natural variants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **270** (6): 524-532.
- Mroczek, R. and R. Dawe (2003). Distribution of retroelements in centromeres and neocentromeres of maize. *Genetics* **165** (2): 809-819.
- Murata, M. (2002). Telomeres and centromeres in plants. *Curr Genomics* **3**: 527-538.
- Murata, M., F. Shibata and E. Yokota (2006). The origin, meiotic behavior, and transmission of a novel minichromosome in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* **115** (4): 311-319.
- Murphy, T. and G. Karpen (1995). Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome. *Cell* **82** (4): 599-609.
- Nagaki, K., J. Song, R. Stupar, A. Parokonny, Q. Yuan, S. Ouyang, J. Liu, J. Hsiao, K. Jones, R. Dawe, C. Buell and J. Jiang (2003a). Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres. *Genetics* **163** (2): 759-770.
- Nagaki, K., P. B. Talbert, C. X. Zhong, R. K. Dawe, S. Henikoff and J. Jiang (2003b). Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of *Arabidopsis thaliana* centromeres. *Genetics* **163** (3): 1221-1225.

- Nagaki, K., Z. Cheng, S. Ouyang, P. Talbert, M. Kim, K. Jones, S. Henikoff, C. Buell and J. Jiang (2004). Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet* **36** (2): 138-145.
- Nagaki, K. and M. Murata (2005). Characterization of CENH3 and centromere-associated DNA sequences in sugarcane. *Chromosome Res* **13** (2): 195-203.
- Nagaki, K., P. Neumann, D. Zhang, S. Ouyang, C. Buell, Z. Cheng and J. Jiang (2005). Structure, divergence, and distribution of the CRR centromeric retrotransposon family in rice. *Mol Biol Evol* **22** (4): 845-855.
- Nakamura, S., S. Asakawa, N. Ohmido, K. Fukui, N. Shimizu and S. Kawasaki (1997). Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta*² using a highly representative rice BAC library. *Mol Genet Genomics* **254** (6): 611-620.
- Nasuda, S., S. Hudakova, I. Schubert, A. Houben and T. Endo (2005). Stable barley chromosomes without centromeric repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* **102** (28): 9842-9847.
- Neumann, P., D. Pozarkova and J. Macas (2003). Highly abundant pea LTR retrotransposon *Ogre* is constitutively transcribed and partially spliced. *Plant Mol Biol* **53** (3): 399-410.
- Neumann, P., H. Yan and Jiming Jiang (2007). The centromeric retrotransposons of rice are transcribed and differentially processed by RNA interference. *Genetics* **176**: 749-761.
- Orgel, L. and F. Crick (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* **284** (5757): 604-607.
- Page, R. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12** (4): 357-358.
- Pal-Bhadra, M., U. Bhadra and J. Birchler (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* **9** (2): 315-327.
- Pal-Bhadra, M., B. Leibovitch, S. Gandhi, M. Rao, U. Bhadra, J. Birchler and S. Elgin (2004). Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* **303** (5658): 669-672.
- Pardue, M., S. Rashkova, E. Casacuberta, P. DeBaryshe, J. George and K. Traverse (2005). Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Res* **13** (5): 443-453.
- Pereira, V. (2004). Insertion bias and purifying selection of retrotransposons in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genome Biol* **5** (10): Artikel R79.
- Peterson-Burch, B., D. Wright, H. Laten and D. Voytas (2000). Retroviruses in plants? *Trends Genet* **16** (4): 151-152.
- Peterson-Burch, B. and D. Voytas (2002). Genes of the Pseudoviridae (*Ty1/copia* retrotransposons). *Mol Biol Evol* **19** (11): 1832-1845.
- Peterson-Burch, B., D. Nettleton and D. Voytas (2004). Genomic neighborhoods for *Arabidopsis* retrotransposons: a role for targeted integration in the distribution of the *Metaviridae*. *Genome Biol* **5** (10): Artikel R78.
- Petrov, D. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet* **17** (1): 23-28.

- Pfeil, B., J. Schlueter, R. Shoemaker and J. Doyle (2005). Placing paleopolyploidy in relation to taxon divergence: a phylogenetic analysis in legumes using 39 gene families. *Syst Biol* **54** (3): 441-454.
- Piegu, B., R. Guyot, N. Picault, A. Roulin, A. Saniyal, H. Kim, K. Collura, D. S. Brar, S. Jackson, R. Wing and O. Panaud (2006). Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res* **16**: 1262-1269.
- Poulter, R. and M. Butler (1998). A retrotransposon family from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes*. *Gene* **215** (2): 241-249.
- Pouteau, S., E. Huttner, M. A. Grandbastien and M. Caboche (1991). Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplasts. *EMBO J* **10** (7): 1911-1918.
- Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* **56** (409): 1-14.
- Rabinowicz, P. (2000). Are obese plant genomes on a diet? *Genome Res* **10** (7): 893-894.
- Rabinowicz, P., L. Palmer, B. May, M. Hemann, S. Lowe, W. McCombie and R. Martienssen (2003). Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Res* **13** (12): 2658-2664.
- Rico-Cabanas, L. and J. Martinez-Izquierdo (2007). CIRE1, a novel transcriptionally active Ty1-copia retrotransposon from Citrus sinensis. *Mol Genet Genomics* **277** (4): 365-377.
- Robertson, K. (2002). DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**: 5361-5379.
- Rocheta, M., J. Cordeiro, M. Oliveira and C. Miguel (2006). PpRT1: the first complete gypsy-like retrotransposon isolated in *Pinus pinaster*. *Planta* **225** (3): 551-562.
- Rostoks, N., Y. Park, W. Ramakrishna, J. Ma, A. Druka, B. Shiloff, P. SanMiguel, Z. Jiang, R. Brueggeman and D. Sandhu (2002). Genomic sequencing reveals gene content, genomic organization, and recombination relationships in barley. *Funct Integr Genomics* **2** (2): 51-59.
- Saghai-Maroo, M., K. Soliman, R. Jorgensen and R. Allard (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **81** (24): 8014-8018.
- Salimath, S. and M. Bhattacharyya (1999). Generation of a soybean BAC library, and identification of DNA sequences tightly linked to the Rps1-k disease resistance gene. *Theor Appl Genetics* **98** (5): 712-720.
- Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: *A laboratory manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandal, N., E. Salentijn, M. Kleene, D. Cai, M. Arens-de Reuver, M. Van Druten, T. de Bock, W. Lange, P. Steen, C. Jung, K. Marcker, W. Stiekema and R. Klein-Lankhorst (1997). Backcrossing of nematode-resistant sugar beet: a second nematode resistance gene at the locus containing Hs1^{pro-1}? *Mol Breed* **3**: 471-480.
- Sandmeyer, S. (2003). Integration by design. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5586-5588.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (12): 5463-5467.

- SanMiguel, P., A. Tikhonov, Y. Jin, N. Motchoulskaia, D. Zakharov, A. Melake-Berhan, P. Springer, K. Edwards, M. Lee, Z. Avramova and J. Bennetzen (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274** (5288): 765-768.
- SanMiguel, P. and J. Bennetzen (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann Bot* **81**: 37-44.
- SanMiguel, P., B. Gaut, A. Tikhonov, Y. Nakajima and J. Bennetzen (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* **20** (1): 43-45.
- Saunders, W. (1993). Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromo specificity. *J Cell Sci* **104**: 573-582.
- Schmidt, T., H. Junghans and M. Metzlauff (1990). Construction of *Beta procumbens*-specific DNA probes and their application for the screening of *B. vulgaris* x *B. procumbens* (2n=19) addition lines. *Theor Appl Genet* **79**: 177-181.
- Schmidt, T., C. Jung and M. Metzlauff (1991). Distribution and evolution of two satellite DNAs in the genus *Beta*. *Theor Appl Genet* **82**: 793-799.
- Schmidt, T. and M. Metzlauff (1991). Cloning and characterization of a *Beta vulgaris* satellite DNA family. *Gene* **101** (2): 247-250.
- Schmidt, T. and J. S. Heslop-Harrison (1993). Variability and evolution of highly repeated DNA sequences in the genus *Beta*. *Genome* **36** (6): 1074-1079.
- Schmidt, T., T. Schwarzacher and J. S. Heslop-Harrison (1994). Physical mapping of rRNA genes by fluorescent *in-situ* hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genet* **88**: 629-636.
- Schmidt, T. and J. S. Heslop-Harrison (1996). High-resolution mapping of repetitive DNA by in situ hybridization: molecular and chromosomal features of prominent dispersed and discretely localized DNA families from the wild beet species *Beta procumbens*. *Plant Mol Biol* **30** (6): 1099-1113.
- Schmidt, T. and J. S. Heslop-Harrison (1998). Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci* **3** (5): 195-199.
- Schmidt, T., S. Kubis, A. Katsiotis, C. Jung and J. S. Heslop-Harrison (1998). Molecular and chromosomal organization of two repetitive DNA sequences with intercalary locations in sugar beet and other *Beta* species. *Theor Appl Genet* **97** (5): 696-704.
- Schramke, V. and R. Allshire (2003). Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science* **301** (5636): 1069-1074.
- Schulman, A. H. and R. Kalendar (2005). A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 598-605.
- Schulte, D., D. Cai, M. Kleine, L. Fan, S. Wang and C. Jung (2006). A complete physical map of a wild beet (*Beta procumbens*) translocation in sugar beet. *Mol Genet Genomics* **275** (5): 504-511.
- Schwarzacher, T. and J. Heslop-Harrison (2000). Practical in situ hybridization. *BIOS Scientific Publishers Limited*, Oxford, UK.

- Senda, M., Y. Onodera, T. Kinoshita and T. Mikami (1995). Mitochondrial gene variation and phylogenetic relationships in the genus *Beta*. *Theor Appl Genetics* **90** (7): 914-919.
- Shibata, F. and M. Murata (2004). Differential localization of the centromere-specific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* **117** (14): 2963-2970.
- Shirasu, K., A. Schulman, T. Lahaye and P. Schulze-Lefert (2000). A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res* **10** (7): 908-915.
- Sijen, T. and R. Plasterk (2003). Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* **426** (6964): 310-314.
- Singer, T., C. Yordan and R. Martienssen (2001). Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev* **15** (5): 591-602.
- Singleton, T. and H. Levin (2002). A long terminal repeat retrotransposon of fission yeast has strong preferences for specific sites of insertion. *Eukar Cell* **1** (1): 44-55.
- Slotkin, R., M. Freeling and D. Lisch (2005). Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. *Nat Genetics* **37**: 641-644.
- Smyth, D., P. Kalitsis, J. Joseph and J. Sentry (1989). Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to Ty3 of yeast and the gypsy group of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** (13): 5015-5019.
- Song, S., T. Gerasimova, M. Kurkulos, J. Boeke and V. Corces (1994). An env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that gypsy is an infectious retrovirus. *Genes Dev* **8** (17): 2046-2057.
- Song, J., F. Dong and J. Jiang (2000). Construction of a bacterial artificial chromosome(BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome* **43** (1): 199-204.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98** (3): 503-517.
- Springer, M. and R. Britten (1993). Phylogenetic relationships of reverse transcriptase and RNase H sequences and aspects of genome structure in the gypsy group of retrotransposons. *Mol Biol Evol* **10** (6): 1370-1379.
- Stern, D. and J. Palmer (1986). Tripartite mitochondrial genome of spinach: physical structure, mitochondrial gene mapping, and locations of transposed chloroplast DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **14** (14): 5651-5666.
- Sugimoto, K., S. Takeda and H. Hirochika (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* **12** (12): 2511-2528.
- Sun, X., J. Wahlstrom and G. Karpen (1997). Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* **91** (7): 1007-1019.
- Sun, X., H. Le, J. Wahlstrom and G. Karpen (2003). Sequence analysis of a functional *Drosophila* centromere. *Genome Res* **13** (2): 182-194.
- Suoniemi, A., A. Narvanto and A. Schulman (1996). The BARE-1 retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Mol Biol* **31** (2): 295-306.

- Suoniemi, A., J. Tanskanen, O. Pentikainen, M. Johnson and A. Schulman (1998). The core domain of retrotransposon integrase in *Hordeum*: predicted structure and evolution. *Mol Biol Evol* **15** (9): 1135-1144.
- Takeda, S., K. Sugimoto, H. Otsuki and H. Hirochika (1998). Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon Tto1 by wounding and methyl jasmonate. *Plant Mol Biol* **36** (3): 365-376.
- Takeda, S., K. Sugimoto, H. Otsuki and H. Hirochika (1999). A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto 1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant J* **18** (4): 383-393.
- Temin, H. (1980). Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* **21** (3): 599-600.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408** (6814): 796-815.
- Theuri, J., T. Phelps-Durr, S. Mathews and J. Birchler (2005). A comparative study of retrotransposons in the centromeric regions of A and B chromosomes of maize. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 203-208.
- Thomas, C. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Ann Rev Genet* **5** (1): 237-256.
- Thompson, J., D. Higgins and T. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22** (22): 4673-4680.
- Topp, C., C. Zhong and R. Dawe (2004). Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (45): 15986-15991.
- Tranzschel, W. (1927). Die Arten der Gattung *Beta*. *Bull. Appl Bot Plant Breed* **17**: 203-223.
- Tuskan, G., *et al.* (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313** (5793): 1596-1604.
- Ulbrich, E. (1934). Natürliche Pflanzenfamilien. In: Engler A. and Prantl K. (eds), 2nd edn.: 457-480.
- USDA (2001). National Plant Germplasm System: *Beta*. USDA National Genetic Resource Program, http://www.ars-grin.gov/npgs/cgc_reports/beta/ch4.html.
- Van Geyt, J., W. Lange, M. Oleo and T. Bock (1990). Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review. *Euphytica* **49** (1): 57-76.
- Varmus, H. and P. Brown (1989). Retroviruses. In: Mobile DNA. Editor Berg D., M. Howe, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA: 53-108.
- Venter, J. *et al.* (2001). The Sequence of the human genome. *Science* **291** (5507): 1304-1351.
- Vicient, C., A. Suoniemi, K. Anamthawat-Jonsson, J. Tanskanen, A. Beharav, E. Nevo and A. Schulman (1999). Retrotransposon BARE-1 and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *Plant Cell* **11** (9): 1769-1784.
- Vicient, C., M. Jaaskelainen, R. Kalendar and A. Schulman (2001a). Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiol* **125** (3): 1283-1292.

- Vicient, C., R. Kalendar and A. Schulman (2001b). Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants. *Genome Res* **11** (12): 2041-2049.
- Vitte, C. and O. Panaud (2003). Formation of solo-LTRs through unequal homologous recombination counterbalances amplifications of LTR retrotransposons in rice *Oryza sativa* L. *Mol Biol Evol* **20** (4): 528-540.
- Vitte, C., T. Ishii, F. Lamy, D. Brar and O. Panaud (2004). Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genomics* **272** (5): 504-511.
- Vitte, C. and O. Panaud (2005). LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 91-107.
- Vitte, C. and J. Bennetzen (2006). Eukaryotic transposable elements and genome evolution special feature: analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (47): 17638-17643.
- Vitte, C., O. Panaud and H. Quesneville (2007). LTR retrotransposons in rice (*Oryza sativa*, L.): recent burst amplifications followed by rapid DNA loss. *BMC Genomics* **8**: 218
Dio: 10.1186/1471-2164-8-218
- Volpe, T., C. Kidner, I. Hall, G. Teng, S. Grewal and R. Martienssen (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297** (5588): 1833-1837.
- Volpe, T., V. Schramke, G. Hamilton, S. White, G. Teng, R. Martienssen and R. Allshire (2003). RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res* **11** (2): 137-146.
- von Sternberg and R. Shapiro, J. (2005). How repeated retroelements format genome function. *Cytogenet Genome Res* **110** (1-4): 108-116.
- Voytas, D., M. Cummings, A. Konieczny, F. Ausubel and S. Rodermel (1992). *Copia*-Like Retrotransposons are Ubiquitous Among Plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** (15): 7124-7128.
- Voytas, D. and J. Boeke (1993). Yeast retrotransposons and tRNAs. *Trends Genet* **9** (12): 421-427.
- Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol Biol* **43** (2): 203-220.
- Waterston, R., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson and P. An (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420** (6915): 520-562.
- Waterston, R., E. Lander and J. Sulston (2003). More on the sequencing of the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (6): 3022-3024.
- Wendel, J. and S. Wessler (2000). Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (12): 6250-6252.
- Wessler, S. (1996). Plant retrotransposons: turned on by stress. *Curr Biol* **6** (8): 959-961.
- Whitelaw, E. and D. Martin (2001). Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genetics* **27**: 361-365.

- Wicker, T., N. Stein, L. Albar, C. Feuillet, E. Schlagenhauf and B. Keller (2001). Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) reveals multiple mechanisms of genome evolution. *Plant J* **26** (3): 307-316.
- Wicker, T., N. Yahiaoui, R. Guyot, E. Schlagenhauf, Z. Liu, J. Dubcovsky and B. Keller (2003). Rapid genome divergence at orthologous LMW glutenin loci of the A and A^m genomes of wheat. *Plant Cell* **15** (5): 1186-1197.
- Wilhelm, M. and F. Wilhelm (2001). Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cell Mol Life Sci* **58** (9): 1246-1262.
- Wong, L., K. Brettingham-Moore, L. Chan, J. Quach, M. Anderson, E. Northrop, R. Hannan, R. Saffery, M. Shaw, E. Williams and K. Choo (2007). Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res* **17** (8): 1146-1160.
- Woo, S., J. Jiang, B. Gill, A. Paterson and R. Wing (1994a). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* **22** (23): 4922-4931.
- Wright, D. and D. Voytas (2001). Athila4 of *Arabidopsis* and Calypso of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses. *Genome Res* **12** (1): 122-131.
- Wright, S., N. Agrawal and T. Bureau (2003). Effects of recombination rate and gene density on transposable element distributions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* **13** (8): 1897-1903.
- Wu, J., H. Yamagata, M. Hayashi-Tsugane, S. Hijishita, M. Fujisawa, M. Shibata, Y. Ito, M. Nakamura, M. Sakaguchi, R. Yoshihara, H. Kobayashi, K. Ito, W. Karasawa, M. Yamamoto, S. Saji, S. Katagiri, H. Kanamori, N. Namiki, Y. Katayose, T. Matsumoto and T. Sasaki (2004). Composition and structure of the centromeric region of rice chromosome 8. *Plant Cell* **16** (4): 967-976.
- Xiong, Y. and T. Eickbush (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J* **9** (10): 3353-3362.
- Yan, H. *et al.* (2006). Genomic and genetic characterization of rice Cen3 reveals extensive transcription and evolutionary implications of a complex centromere. *Plant Cell* **18** (9): 2123-2133.
- Yang, T., S. Lee, S. Chang, Y. Yu, H. de Jong and R. Wing (2005). In-depth sequence analysis of the tomato chromosome 12 centromeric region: identification of a large CAA block and characterization of pericentromere retrotransposons. *Chromosoma* **114** (2): 103-117.
- Yu, J., S. Hu, J. Wang, G. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou and X. Zhang (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296** (5565): 79-92.
- Zhang, Y., Y. Huang, L. Zhang, Y. Li, T. Lu, Y. Lu., Q. Feng, Q. Zhao, Z. Cheng, Y. Xue, R. Wing and B. Han (2004). Structural features of the rice chromosome 4 centromere. *Nucleic Acids Res* **32** (6): 2023-2030.
- Zhong, C., J. Marshall, C. Topp, R. Mroczek, A. Kato, K. Nagaki, J. Birchler, J. Jiang and R. Dawe (2002). Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3. *Plant Cell* **14** (11): 2825-2836.
- Zilberman, D., X. Cao, S. Jacobsen (2003). ARGONAUTE4 Control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299** (5607): 716-719.

7 ABKÜRZUNGEN

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
λ-DNA	DNA des Bakteriophagen Lambda
A	Adenin
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
AFLP	„Amplified fragment length polymorphism“
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	„Bacterial artificial chromosome“
β-GAL	β-Galactosidase
BLAST	„Basic local alignment search tool“
bp (Mbp, Kbp)	Basenpaare (Mega-, Kilo-)
BSA	„Bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	DNA-Kopie einer RNA-Matrize
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Ci	Curie
CM	Chloramphenicol
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cy3	Cyanin, Fluorochrom
DAPI	4,6 Diamino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
d.h.	dass heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	„European Molecular Biological Laboratory“
<i>env</i>	„envelope“, Leseraster mit Ähnlichkeit zu retroviralen Hüllproteinen
EST	„Expressed sequence tag“

FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat, Fluorochrom
G	Guanin
g (mg, µg, ng, pg)	Gramm (Milli-, Mikro-, Nano-, Piko-)
<i>gag</i>	„group-specific antigen“, Leseraster in Retroelementen
h	Stunde
I	Inosin
int	Integrase
iPCR	Inverse PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	di-Kaliumhydrogenphosphat
kV	Kilovolt
l (ml, µl)	Liter (Milli-, Mikro-)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LINE	„Long interspersed nuclear elements“
LTR	„Long terminal repeat“
M (µM) (Maßeinheit)	molar (mikro-)
M	DNA-Größenmarker
mA	Milliampere
MC	„Molecular Clock“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MITEs	„Miniature inverted-repeat transposable element“
mmol (pmol)	Millimol (Piko-)
mRNA	„messenger“-RNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
nm	Nanometer
NOR	Nukleus Organisator Region
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
³² P	radioaktives Isotop
PAA	Polyacrylamid
PBS	Primerbindungsstelle („primer binding site“)
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:24:1)
PCR	„Polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
p(dN) ₆	hexamerer Zufallsprimer

PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>pol</i>	„polyprotein“, Leseraster in Retroelementen
PPT	Polypurintrakt
Prot	Protease
PTGS	„Posttranscriptional gene silencing“
PVP 40	Polyvinylpyrrolidon 40
®	eingetragene Marke
rDNA,-RNA	ribosomale DNA,-RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
R-Region	„Repeated RNA region“ (Teil des LTR)
RT	Raumtemperatur
RT-Sonde	DNA-Sonde für die Reverse Transkriptase
RT-PCR	Herstellung einer cDNA-Kopie aus einer RNA-Matrize mittels Reverse Transkription und anschließender PCR
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat
s	Sekunde(n)
siRNA	„small interfering RNA“
SINE	„Short interspersed nuclear elements“
SSC	„Saline sodium citrate“ (Natriumcitrat)salz)
Supsp, ssp	„subspecies“, Unterart
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TE	transposables Element
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGS	„Transcriptional gene silencing“
TIR	„Terminal inverted repeat“
TM	Handelsmarke
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TSD	Zielsequenzverdopplung („target site duplication“)
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonolaureat
U	Units
U3-, U5-Region	„Unique 5'/3'-RNA region“ (Teil des LTR)
UTR	untranslatierte Region
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V/cm	Volt pro Zentimeter
VE	vollentsalzt
VLP	„Virus-like particle“
Vol	Volumen
X	Abstand zwischen Aminosäuren
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galaktopyranosid

8 ANHANG

Tab.A1: Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Produkt	Hersteller
α -[³² P]-dATP, 3000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Ltd, UK
α -[³² P]-dCTP, 3000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Ltd, UK
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose, Seakem® LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anti-Digoxigenin-Antikörper-FITC	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ATP	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Bacto-Agar	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Biotin-16-dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Blockingreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
BSA (Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Serva Feinchemikalien, Heidelberg
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Chromschwefelsäure	Merck, Darmstadt
Citifluor AF1	Chem. Lab. Canterbury, UK
DAPI	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
DEPC	Roth, Karlsruhe
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
DIG-Nick-Translation Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol p.A. (100%)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol p.A. (96%)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll® 400	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Formamid (100%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formamid (37%)	AppliChem, Darmstadt
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GT-Mix	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Roth, Karlsruhe
Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
Immersionsöl 518C	Carl Zeiss, Oberkochen
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Klenow-Puffer	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
λ -DNA	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Lysozym	Serva Feinchemikalien, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt

Produkt	Hersteller
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nukleotid-Set	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PCR-Puffer	Amersham Biosciences, Freiburg
PEG 6000	Roth, Karlsruhe
Phenol (Tris-stabilisiert)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Polyvinylpyrrolidon	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Random Hexamer Primer	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Röntgenentwickler- und Fixierer Adefo	MS Laborgeräte, Wiesloh
Rotiphorese [®] NF-Acrylamid/Bis-Lsg. (40%)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] NF-Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sephadex G50	Amersham Biosciences, Freiburg
Streptavidin-Cy3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
T4 DNA-Ligase 10x Puffer	Amersham Biosciences, Freiburg
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Tris, ultrapure	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe
Triton X100	Roth, Karlsruhe
Trizol	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
X-Gal	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Serva Feinchemikalien, Heidelberg

Tab.A2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und ihre Bezugsquellen.

Produkt	Hersteller
Cryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Deckgläser	Menzel Gläser [®] , Walter, Kiel
DNase/RNase freie SafeSeal-Filtertips	Biozym, Hess. Oldendorf
Einheitserde Typ ED73	Walter, Kiel
Filtropur-Filter	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Gel-Blotting-Papier (Whatman-Papier)	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond N ⁺ , Nylon Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
Hyperfilm TM MP	Amersham Pharmacia Biotech Ltd., UK
Miracloth	Calbiochem über VWR Internat., Darmstadt
Objektträger	Menzel Gläser [®] , Walter, Kiel
Parafilm	VWR International, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Photofilm Fujicolor Superia X-TRA 400	Fuji Photo Film, Tilburg, The Netherlands
Polyethylenschlauch	Eydam, Kiel
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
sterile Röhrchen (14 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg

AAAAAAGAACTCTGAAAAAGGAGGATGAATGCAATGAAGATGTTCTTGTGTGATGAAGTGAAGAGATGATCATCTTAGCTTGGTTCTAAGCGGGTCCTTCACTCCAAAGAAGCCGAA
K K E S E K E D E C N E D V L V D E V E G D D H L S L V L R R V L H S K E A E
GCTATACCATCTCAACGAGACGAGATTTTTCAAAACAAAATGCTTAATCAAGGGCAAGATTTTGTTCATGATATTATGATGGTGGGAGTTGCACTAATGTAGCTTCGAGTTCTATGGTG
A I P S Q R D Q I F Q T K C L I K G K I C S M I I D G G S C T N V A S S S M V

Protease

GAGAAGCTCAATTATCCTACTTTTCAGTCACTCCTAAACCATATAAAGCTTCAATTGGCTTAATGATGGTACTGTGTGGAGGTACAAACAAGCTTTAAATTAGCTTCTCTTTTGGTGATTTCG
E K L N Y P T F S H P K P Y K L H W L N D G T V W R Y K Q A L I S F S F G D S
TATAATGATAAGGTTTATGTGATGTGGTGCCTATGAATGCATGTCTATTTCTCTTAGGGAGCCGTGGCAATCTGTATAAGGAAACCTTACATAATGGTAGGACTAATACATACACT
Y N D K V L C D V V P M N A C H I L L G R P W Q S D K E T L H N G R T N T Y T
TTTCATGCATGAAAAACAGGAAAAATTATACTTAGTCCTAGCAAAAAAGGGTCCGAATTTGCCTAAGAAAGAACCTCTAATTCAAGGGCTAAAAATCAGAAATCCTTAATTCTCCAAAAA
F M H E N R K I I L S P S K K G P N L P K K E T S N S K A K N Q K S L I L Q K
CACCAAGTTGATAAGGCCAATTGAAAAAGGGGAAGGAAATGTACTTGTGTGTATTGTCTGCAAAATGATGAAAACTCTCGTGAAATTACATGATTTGGTTAAACCATTAGTGAACGAT
H Q V D K A I E K G K E M Y L L L F A A N D E N T R E L H D W V K P L V N D
TTTAGTGATATTTTCCCGAGGATCTTCCCTATGGTTTACCACCTAGTAGGGGTATTGAGCATCAAAATTGACTTAGTTCCCTGGAGCACCATTACCTAACAAAGGCAGCTTATAGATGT
F S D I F P E D L P Y G L P P S R G I E H Q I D L V P G A P L P N K A A Y R C
AATCTGAAGAAGCTAAAGAGTTGCAAAAACAGATTACTGAAATTGTAGTTAAGGGAATTTGTACAAGAAAGTCTTAGTCCATGTGTCTGTTCTGTTATTTTGGTTCCAAAGAAGGAT
N P E E A K E L Q K Q I T E L L A K G F V Q E S L S P C A V P V I L V P K K D
GGAACATATGCGTATGTGTAGATTGCAGGGCTATAAACACATTACCATCAAGTATAGTATCTCTATTCTCTAGACTTTGCTCGATGAATTACATGGTGTCTACTATATTC
G T M R M C V D C R A I N N I T I K Y R Y P I P R L D L L D E L H G A T I F
TCCAAGATAGATTTCGTGTATCATCAGATTTCGAATCAAGGAAGGAGATGAATGGAACACAGCCTTTAAGACTAAGAGTGGGTTATATGAGTGGCGTGTATTATGCCATTTGGT
S K I D L R S G Y H Q I R I K E G D E W K T A F K T K S G L Y E W R V M P F G
TTAACTAATGCTCCTAGTACTTTTCATGAGGCTCATGCATGAGGTACTTCGTCTCTTTCATTTGGTTGGTTTATTTGATGATAATCTTGTGTATAGCAACAGTGAACAG
L T N A P S T F M R L M H E V L R P F I G S F V V Y F D D I L V V Y S N S E Q

Reverse Transkriptase

GATCATCTTATTCATCTGAAGAAGGTTTTCCTTAAGCTAAGSGAAAAAGAGTATATGCAAAAGATGGAGAAGTGTGAATTCCTTCACCTTAGTGTGTCCTTTCTTGGTTTCATTTAT
D H L I H L K K V F L K L R E K K L Y A K M E K C E F F T S S V S F L G F I I
TCATCTCAGGGTATTTCTATGGATGAATCCAAGGTGGAGGCAATTAAATCATGGCCAATTCCAAGTCCATCACAAGATTTCGAAGTTTTCATGGATTGGCATCTTTTACAGGAGA
S S Q G I S M D E S K V E A I K S W P I P K S I T E V R S F H G L A S F Y R R
TTTCATCAGAGGTTTGTAGTACTATTTTGGCTCCACTGACCGGAATGTATCAAGGGGGTTCTTTTCACCTTGGACTCCAGCAGTCAGGAAGCATTTGATCAGTTGAAAAGCAAGCTTTGT
F I R G F S T I L A P L T E C I K G G S F T W T P A A Q E A F D Q L K S K L C
GAGCGCCTGTTCTAGCCTTACCAGATTTCAAGAAAGTGTTCGAAGTGGATGTGATGCAAGTGGCGTAGGGATTGGAGCTGTTTTTACAAGGAGGGCGCTCCCATAGCCTATTTTC
E A P V L A L P D F K K V F E V E C D A S G V G I G A V L Q Q G G R P I A Y F

RNAseH

AGTGAGAAAGCTCAATCATGCCAAGCTCAACTACAGCACCTATGATAAAGAGTTCATGCTATTTGCTTCGTGCCTTGACTCAATTATGGACTCAATTATCTTAGGCCAGCTCAGTTTGTGTG
S E K L N H A K L N Y S T Y D K E F Y A I V R A L T Y W T H Y L R P A Q F V L
CATTGAGATCATCAAGCTTTGAAGTACATTAAATGGACAACATAAGCTCAGTTTCACGGCATGTAAATGGGTGGAGTTCCITCAATCTTTTGTATTTTAAAGTACAAAACTGGA
H S D H Q A L K Y I N G Q H K L S S R H A K W V E F L Q S F D F V L K Y K T G

GTTCCTAAATGTGGTTGCAGATGGGTTATCTAGAGGCAATCTATGCTTTCTCTAATGGAGGCTCGAGTTCTTGGCTTCACCTCATATTAAGSAGCTTTTATATGATGATCCAGATTTT
V S N V V A D A L S R R H S M L S L M E A R V L G F T H I K E L Y Y D D P D F
TCACCATTGATAAGCGTGCAAGGATGGTTCTCATGGAGCTTATTCCGGTTCTAGATGGTTTCTCTCCGAAAATAAAGCTTTGTATCCTTAAAGTGCCTCACTAAAGGATTTGCTC
S P L I E A C K D G S H G A Y S V L D G F L F R N N K L C I L K C S L R D L L
ATCAAGGAGGTTTCATGGAGGCGCTAGCAGGCAATTTTGGTATTAACAAACTGTGGATGTTTGCAGGAACACACTTTTATGGCCAAACTGGCAGGTGATGTTTCACTCAGTTCTA
I K E V H G G L A G H F G I N K T V D V L Q E H F Y W P K L A G D V H S V L

Zink-Fingermotiv

GCCTCGATGTTCTACATGTCAAAGGCCAAGAGTTCTTTTCATCAAGGGCTCTATACTCCACTTCCAGTTCCCTTAATCATGCCATGGGAAGATGTAGTATGGATTTCAATTGCGCTTTG
A R C S T C Q K A K S S F H Q G L Y T P L P V P N Q P W E D V S M D F I V A L
CCTAGGACTCAAAGGCAAGATGCTATTATGGTGGTGGTGATCGATTCTCAAAGATGGCTCATTTTCATTCGCTTGCAACAAGACGGATGATGCAATTCATGTAGCTGATTTGTAC
P R T Q R Q R D A I M V V V D R F S K M A H F I A C N K T D D A I H V A D L Y
TTCAAGGAGATCATTAGATTACATGGTGTACCGAAGACTATTGTTTCTGTATAAGGATGTTAAAGTTCCTTAGTTTCTTTTGGAAAGACTTTTATGGAAGCTCCTAGGTACTAAAGCTCCTC
F K E I I R L H G V P K T I V S D K D V K F L S F F W K T L W K L L G T K L L
TTTAGTACCACGGCGCATCCACAAACTGATGGTCAAAACGGAGGTTACAAACAGGACACTTACTACTCTCAGGACTCTAGTTAAACAAGTCACAGAAAAGATTGGGATCTAAAGCTA
F S T T A H P Q T D G Q T E V T N R T L T L R T L V N K S Q K D W D L K L

Integrase

GCACATGCAGAAATTTGCTTATAATAGATCACCTACATATGCCACGAAAGTGCTCTCCATTCCGAAGTAAACTATGGGGTTAATCCTTTTAAGCCCCATTGATTTTACTACCTATTCAGTT
A H A E F A Y N R S P T Y A T K C S P F E V N Y G V N P L S P I D L L P I P V
GAAGTGAGACAAAGCATGCAGAGGAGGCAAGGATGAAAAGCTTACCAACAGATTAGAGCAGCATTTGAGAAGGTTAATGAGCTTACAAGGTCCAAGCTAACAAAG
E V R Q S K D A E E K A K E M K L H Q Q I R A R I E K V N E A Y K V Q A N K
CATCGAAAGGAGTCATTTACAAGCCCGGGAAGTGGTATGGTTGCACCTAAGGAAGGAAGCATTTCCATCAAGAAAGGAACAAGCTGATGCCAAGGAGTGATGGTCCATTAGG
H R K E V I Y K P G D L V W L H L R K E R F P S R R K N K L M P R S D G P F R
GTGCTTGAAAAGATCAATAACAATGCATACAAGATAGAACTACCAAGTGAGATGGGCAACAATTTGGCCACCTTCAATGTGGGTGATTTAGCTCCATATTTAGAAGAAGATTTTGAG
V L E K I N N A Y K I E L P S E M G N I S A T F N V G D L A P Y L E E D F E

PPT

TTACAAGAAGACTTCTCCAACCTAGCGAGAGCATCCATGATCAATCCAAGTCTCCTTAACAAGATCATCAAGAAGAGATTAAGGTGAAGGATTCAGTTTCATT
L Q E D F S K P G E N D A G A S M I N P S L L T K S H Q E E I K V K E I Q F I
AGCTTACTTAATCCAATTTCGAACAAACAAGTACTTCGAAATGTGTTAATTAAAGCTTAACACCTTCTTAATCTTTTAAAGCCTTGTTGATTAATGCTTATGATCATCTTAACATCAT
S L L N P I S N K Q V L R I V N *

AACTATTAGTAAATAAGCTTGAAATATGATTAAATAGCTTAAATAGTTAGTTCTAAAGTAAAGCTTAGTGAACTGTTTGGAAAGAACAGAAATTTATACGGTTTGTATTAGG
GCACATTTTGGCTACGTTTGTAGCTTTATCTTGGCTAAGGCAACCATACATGACTCACCTGTGTGCTTACATACATCACCAACAAGCATGTGAAGAGTTGGAGGCAAGAATCAAT
AGGAAATGAGAGCTTCATGGAGAGTATCCAAAACCGCAGCTGGGAGGCGTCATCTGGTCCCTCTCTCATCAGTTCTGGCAGCCGCTCTTTTATAGCTTTTGGAGCTGATTTT
GAGGATAATTTTCCCTTAGAATGTCTATTTAATACCTTAGCTTCCCTTTTGGAGTAGGACATTTTGGTTCTCAGAAATCCCTCAATCAATGACCTTAGGTACTGAAACACTGGCCAGAT
TTTGTAAATAGTTAAGATGGCTTTTGTACCTAAGCAAAACATCACCAATGACGTGAATTTTGGTATGTACTGCTTTATATGTTAGGTTGTGAAGCAAGAAAGTTTGAATTAGA
CTTTGTTGAATGAATTAAGAGTTATACTCATTTCTTTGAGCTGTGCGCTTAGAGCAAAAACCTGGACAGTTTGTCTCAATTAAGTCTTTGAGCTTAATGCTAACTAACGTAGATTA
GTTACTAATTTAACAAAGCAAGGTTGCACCAAGAGTTCTTCTTTGACATTTGGTGGCCTAGTTTGGTGGTCTTAAGGCTAGTGAAAGTGGTGGTTGTGGTAGCGTTCCCAACAAGGCT
TGAAAGCAAAACTGATTCCTCGGTTCTTAACCAACGAATGCTCTTGCTTATGAATAATGCTTTATGCAATCA

GATGATAAGACTTGTGTTGATGGTTAAGAAACAAGCCCCCTTGTGTCCTTTTCGATTGGTAGCTACAAAGATGAGTTGTGGGTGATGTTCTTCCTATGAGTGTCTGTCATGTTCTTCTT
 D D K T C L M V K K Q A L V S F S I G S Y K D E L W G D V L P M S A C H V L L
 GGTAGACCTTTGCAATTTGATCGAAAGATTATCATGAGGGGAGACCAATGTGTATTCGTGTTTGTATGGGTCCAAAAGGATTCGACTTATGCCCCTTGTCTCTTAACACTATTGCG
 G R P L Q F D R K I I H E G E T N V Y S V L M G S K R I R L M P L S P N T I A
 CCAAAGAGAGGATGAAGCAAGCAAGTTTGTTCCTTTCAACCCAAAGAGTCGAAAAGGAGGTGAAGTAGAAGGTATGCTGTTATGTTTATTTGTTAAATGTACTTTAACTAAT
 P K K R D E S K Q S L F L S P K E F E K E V E G H G Y V L F V K C T L T N
 GATGTGCTATGAAGGATCCTAACCTTGACGCTTTGTAGAGGAGTTTGGGATGTATTTCCCAAAGAGTTGCTCAAGGTTTACCCTTTGAGAGGGAATTGAGCATGCTATTGAT
 D V S M K D P N L A A L L E E F G D V F P K E L P Q G L P P L R G I E H A I D
 CTAGTGCCAGGCGACCTTTGCCTAACAAACCAGCATATAGATGCGATCCATGCGCTTCTAAGGAGCTACAAACACAGATTGAAGAGTTGATGAACGAGGCTATGTGAAGAATGC
 L V P G A P L P N K P A Y R C D P M A S K E L Q T Q I E E L I E R G Y V K E C
 ATGAGTCCATGCGCGCTTCCCTGCCCTTCTTGTCCCTAAGAAGGATGGTACATGGAGGATTTGCATTGATAGTAGGGCTTCAACAACACATCACCATCAAGTATCGCTTTCCTATGCT
 M S P C A V P A L L V P K K D G T W R I C I D S R A F N N I T I K Y R F P M P
 AGATTGGAGGACATGCTTGATGAGTTACATGGAGCTTTTGGTGTTTTCAAAGATAGACCTAAGGAGTGGATATCACCAATGAGAATTAGGGAAGGAGATGAGTGGAAAACCGCTTTT
 R L E D M L D E L H G A L V F S K I D L R S G Y H Q M R I R E G D E W K T A F
 AAGACCAACAAGTCTATAGATGGATGGTATGCCCTTTTGGTCTTTGCAATGCTCCTAGTTCTTTTATGAGGCTTATGAATGAGGTACTACGTCCCCTTTCTTAACAAGTTTATTT
 K T K Q G L Y E W M V M P F G L C N A P S S F M R L M N E V L R P F L N K F I
 GTGTCTATCTAGATGATATTCCTTGTCCTATAGTACTAGTATTAAGTCTCAITTAGCTCAITTAAGACTGTGTTTGAATAATTGAGAGAACAAAAAATCTGTATGGCAAGATGGAATAA
 V V Y L D D I L V Y S T S I E S H L A H L R L L F E K L R E Q K L Y G K M E K

Reverse Transkriptase

TGTGACTTCTTGTAACCTAGTATGCTTTTCTGGCTATATGTTTCTAGGATGGATACATGTTGATCCAGAGAAAGTCAAAGCTATTTCACATGTTGGCGCCCAAGCAATGCT
 C D F L V P S I A F L G Y I V S R D G V H V D P E K V K A I S T W L A P S N A
 CATGAGTGTAGAAGTTTTCATGGCCTAGCTTCCCTTCTATAGGAGGTTTCATTCGAAACCTTCTCAACAGTTATGGCTCCAATCAGAGTTGATGAAGAAGGAGAGTTTTCCTTGGAAC
 H E C R S F H G L A S F Y R R F I R N F S T V M A P I T E L M K K G E F S W N
 TCTAAAGCTCAAATATCATTTAAAGAGGTGAAGAGGCTCCCTTTGCAACGCCCTATCCTAGCCTTGCCAGATTTTCACAAATTGTTTCGAGGTAGAGTGTGATGCAAGTGGGATTGGC
 S K A Q I S F K E V K R L L C N A P I L A L P D F H K L F E V E C D A S G I G

RNAseH

ATAGGTGCTGTTTGTATCCAAGAGAAGAGGCGCTATTGCAATTCCTTTAGTGAGAAATTGAGTGGCGCCAAGCTCAATTACTCCAATTATGATCGTGAGTTTATGCTATTGTAAGGGCC
 I G A V L I Q I E K R P I A F F S E K L S G A K L N Y S N Y D R E F Y A I V R A
 TTGGATCATTTGGTCTCACTATTTAAGGCCAAAGCCCTTTTATACTTCAATTCAGATCATGAGGCACCTCAACACATCCATGGCAACAAAAGCTCAATTATAGGCACGCCAAGTGGGTT
 L D H W S H Y L R P K P F I L H S D H E A L K H I H G Q Q K L N Y R H A K W V
GAATTCCTACAAATCTTTTACTTTCTTCTTAAGTATAAAGAAAGGAAAGATAATGTTGTTGCTGATGCTCTTTC TAGGCGTTCCCTATCTCTTAACCATGGTGTGATGCTCGFATTTTA
 E F L Q S F T F S S K Y K E G K S N V V A D A L S R R S Y L L T M V D A R I L
 GGGTTTGTATCAITTTGAAGAAGATTGTATGTAAGAAGATGAAGACTTTTGTAAITCTTTTAATAACCTAATGGCATGTATGTAGTCAAGAAGGATTTCTGTTTAAAGGGGAACAGGCTT
 G F D H L K E L Y V K D E D F C N S F N N P N G M Y V V Q E G F L F K G N R L
 TGTGTTCCCTCAAAGTGGCGTGAGGAGTTGTTGGTGAGGGAAGTCCATAGTGTGGCTGGCTGGCCATTTTGGCATTCAAAAGACCCCTAGACACATTTGATGAAAGTTTCCATTGG
 C V P Q S G V R E L L V R E V H S G G V A G H F G I Q K T L D T L S E S F H W

Zink-Fingermotiv

CCTAGCATGGTGAAGAATGTTTCATATAGTGGTGTAGTAGGTGTGCTAGTTGTCAAAAGGGCCCAAGAGTACCTTCCATAAAAGGCCCTATACACTCCATTACTAGTCCCTAAATGCTCCTTGG
P S M V K D V H M V V S R C A S C Q R A K S T F H K G L Y T P L L V P N A P W
GATAGTGTGAGTATGGATTTTCATAGTAGGGTTGCCTAGAACTCAAAAGGG/GGAAAGATGCTATCATGGTAGTGGTAGATCGTTTC/TAAGATGGCTCACTTTGTACCTATGCATATAA
S K M A H F V P M H K

D S V S M D F I V G L P R T Q R G K D A I M V V D R F

ACTGATGATGCTTTACATGTTGCTGATTTGTACTTTAGGGAGATCATTCGCCTACATGGCATCCCTAGAAAGTATGTTAGTGATCGTGAITCCAAAGTTCCTAAGTCACTTTGGGAGGA
T D D A L H V A D L Y F R E I I R L H G I P R S I V S D R D S K F L S H F W R
GCTTGTGGGAGATGGTTGGAACCAAGTTACTTTTCAGTACTAGTACATCATCTCAAACTGATGGCCAACTGAAGTAACTAAGAACTCTTTGGAGCTTTTATTTGCGTGGTTTGGTG
S L W E M V G T K L L F S T S H H P Q T D G Q T E V T N R T L G A L L R G L V

Integrase

AGTAAAAACAAAAGGATTGGGATATGAAGCTCGCCCATGCTGAATTTTGCTTATAATCGAGCTCATTCACCACTACCCCTCAATCTCCATTTAAGTGGTTTATGGTATCAATCCT
S K T Q K D W D M K L A H A E F A Y N R A H S T T T P Q S P F K V Y G I N P
TTCCTTCCTATTGATTTTATTGTACTAACCAAATCTGAAATTCATGTTGATGCAAAAGAGAGGTTTCGAAACCTTCAAAAAACCGTGTGAGCAAGTCAAGGCAAGAAATAGAAAAAGATG
F L P I D F I V L T K S E I H V D A K K R F E T F K K T C E Q V K A R I E K M
AACACTCAATACAAAGGAGAGAGCAAAACAAGCATAGAAAGGCAACCAAGTTCCAAAAGTTCGCGATCTTGTGTGGATTCAATTTGAGAAAAAGAGAGGTTCCCAAGCAAGAGGAAAGAAATAAG
N T Q Y K E R A N K H R R Q P K F K S G D L V I H L R K E R F P S K R K N K
CTCATGCCTAGAGCTGATGGTCCCTTTGAGGTGCTTTGAGGTGATTTTGGAGAAAGTG/CCTACAAAGATTGATCTTCCAAAGTGAAGTATGGAGGTGTGAGTGTGCTACCTTCAACGTTTGG
L M P R A D G P F E V L E V I L E K V

A Y K I D L P S E Y G G V S A T F N V G

PPT

GATCTTAGTCCTTACTATGATGATGAAAAATTTGTGGACAAATTCCTTTTGAAGAGGGGAGAAATGACATGAGTCTAGAGCCAAAGTCAACCATTGGAGATGAGCCTATTTCCTTGGTT
D L S P Y Y D D E N L W T N S F E E G E N D M S L E P K S T I G D E P I C L V
CTTGAGACCTTTTGGATTCAAGCTCAAGGCCAAATGGATCTTTTGTGACTATGTAGCTTGGGAAGAAGAACTAGCTTGAATGGCTAAATATGGGGCGTCCATAGCCATTTATAGAGTA
L E T F G F K L K A N G S F V T M L A W E E L A *

TTCTATTTGCTTTTGTGATCATTTTATTTCATGTAATAAACTACATTAGGATCGAAATTCGGTTGGTTATGTAGATTCCTTAGGTTCCAAATCCTATTTGGGATTAGGATTGC
GTGTGAAAGTGATAAGGCCGATGCCATCATTTTCCTTAGGTGCTTATCCCTTGTCTTATCTTTCCCTTCATTTTAGGGATTAGTTTTTATCTTGTCTTTTAGATAGAAATTAGGGTT
CCTTATCATACTAGAGTGTAAGTATAAATAAGGAGCTATGTACGCCATTTTTCATTCAGAAAAATGTTAAGAACTTTTGAGTCATTTTTCGAGCTTAAATGTTTGTCAATTAAATTC
GTGCCATTTAAATAATTTTCAGGAGTGATAATTTATTGAGTGATTAATCTACTTAATTCAGGAGTGTTTAAAGTGAGATTCAAAGTTAATTAATCTTTTCAGGAGTGAATTGATTTAAT
TTCCATATCCCATFAACACATAAAGATACAAACTTTAGCCACAAAAACACATAAAAAATTCGGACTTTTAAATATCTAGGTTCCCTTGTGATTGGAGTACACTTGAATATCGCTTTCATA
GAGCCATATTCATATCA

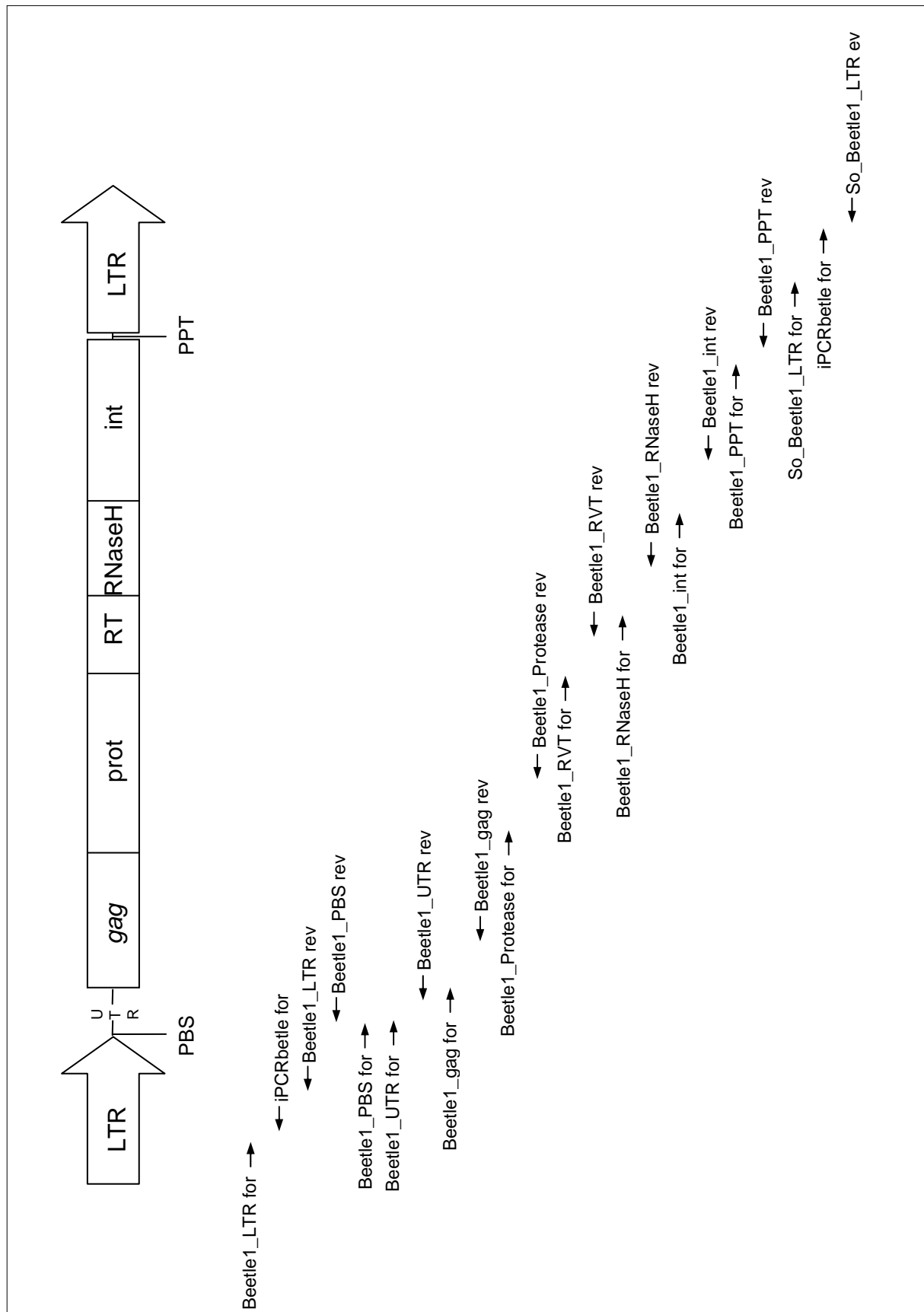


Abb. A3: *Beetle1*-Primerkarte.

Maßstabsgetreue Darstellung der Lage und Orientierung relevanter Primerkombinationen, die zur Amplifikation definierter Sequenzbereiche verwendet wurden, an die Gesamtstruktur von *Beetle1*. Das Pfeilende definiert die Startposition der Primer und die Pfeilspitze zeigt in 5'→3'-Orientierung.

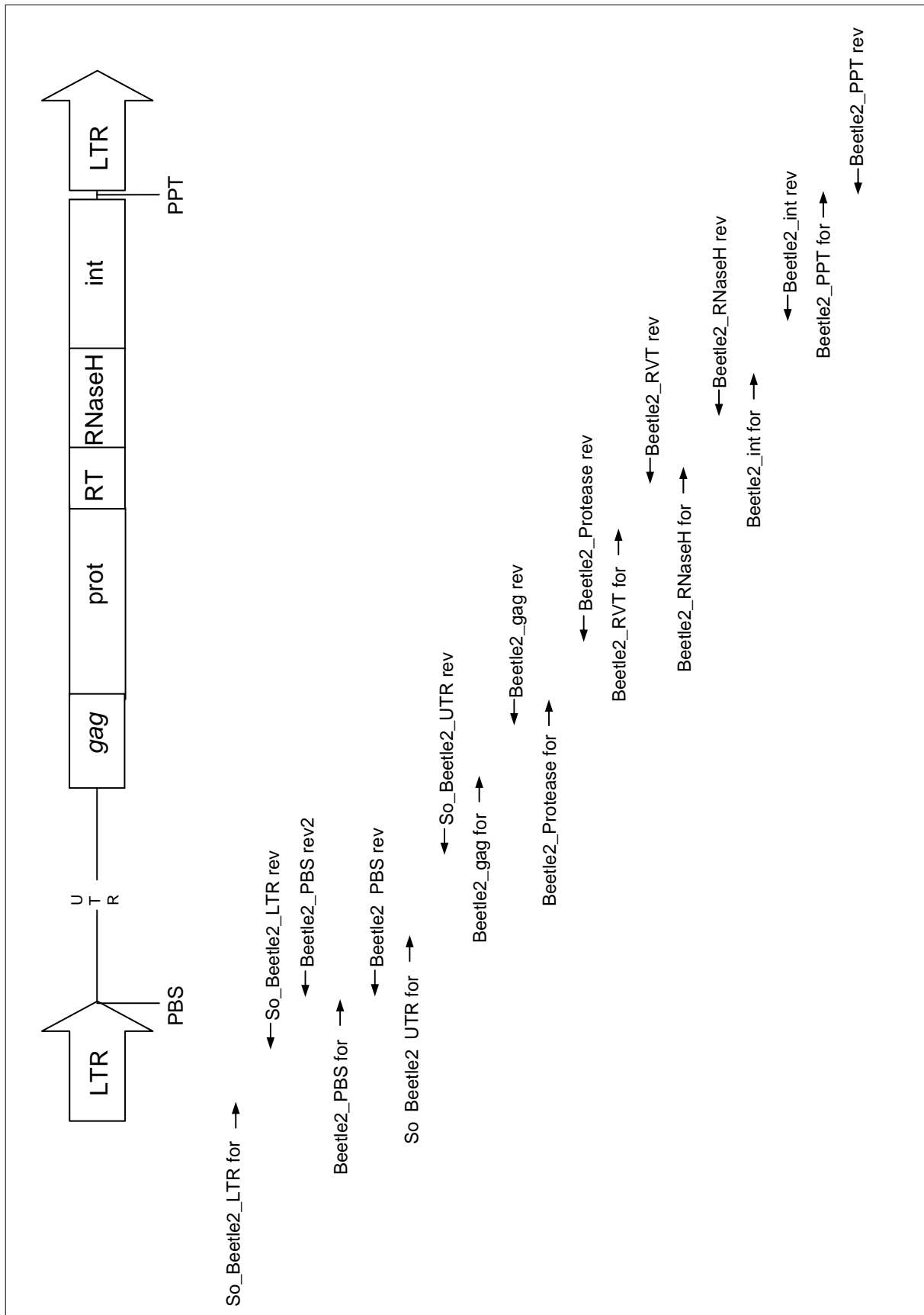


Abb. A4: *Beetle2*-Primerkarte.

Maßstabsgetreue Darstellung der Lage und Orientierung relevanter Primerkombinationen, die zur Amplifikation definierter Sequenzbereiche verwendet wurden, an die Gesamtstruktur von *Beetle2*. Das Pfeilende definiert die Startposition der Primer und die Pfeilspitze zeigt in 5'→3'-Orientierung.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik am Lehrstuhl für Zell-und Molekularbiologie der Pflanzen der Technischen Universität Dresden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Schmidt angefertigt.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 04. September 2007

Beatrice Weber

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Schmidt für die Überlassung des Themas, seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine konstruktiven Vorschläge zur Verbesserung der Arbeit, welche mir besonders in der Endphase eine große Hilfe waren.

Nicole Pinnow, Brigitte Neidhardt-Olf, Swenja Tams, Verena Kowalewski und Maike Schneider danke ich im Speziellen für die Einführung in die Welt der Molekularbiologie. Für die methodische Unterstützung und das scharfe Auge beim FISHen möchte ich mich bei Ines Walter bedanken. Allen anderen Freunden und Kollegen gilt der Dank für den Austausch von Reagenzien und Erfahrungen und das angenehme Arbeitsklima.

Gunnar Jacobs und Cora Wollrab sei an dieser Stelle für die bereitwillige Korrektur des Manuskripts und die wertvollen Ratschläge gedankt. Darüber hinaus war mir Cora, vor allem in der Endphase der Arbeit, eine große Stütze und hatte jederzeit ein offenes Ohr für mich.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die Geduld, die Unterstützung in allen Lebenslagen und Ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten. Besonderer Dank gilt dabei meinem Mann Christian, der seine beruflichen Interessen hinter mein berufliches Fortkommen gestellt hat. Danke für die moralische Unterstützung, vor allem während der Dissertation, und das anhaltende Bestreben mich zeitweise den Labortiefen zu entreißen. Dank gilt auch meinen Töchtern, die mein Durchhaltevermögen in vielerlei Hinsicht gefordert und seit ihrer Geburt viel Freude in mein Leben gebracht haben.

Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der FAZIT-Stiftung gefördert und im Rahmen eines BioFuture-Projekts des BMBF (0311860) fortgeführt.